

ANNALES  
DE  
L'INSTITUT PASTEUR

---

CULTURE *IN VITRO* DU VIRUS DE LA POLIOMYÉLITE  
EN PRÉSENCE DE TISSU TONSILLAIRE HUMAIN (\*)

par G. BARSKI, P. LÉPINE, V. MONACI (\*\*) et G. DE BRION.

(*Institut Pasteur. Service des Virus.*)

La multiplication du virus de la poliomyélite en culture *in vitro* et sur des tissus humains autres que le tissu nerveux a été démontrée pour la première fois par Enders, Weller et Robbins [1]. Ce phénomène a été mis à profit pour la culture *in vitro* en série continue de ce virus par de nombreux auteurs déjà et appliqué à l'isolement et au typage de souches de poliomyélite ainsi qu'à la recherche des anticorps spécifiques dans le sérum de malades ou de sujets normaux.

Enders et ses collaborateurs utilisent couramment à cette fin la culture de fragments de tissu embryonnaire humain. Smith, Chambers et Evans [2], Syverton et coll. [3], Younger, Ward et Salk [4], ainsi que Ledinko, Riordan et Melnick [5], se servent avec succès du tissu testiculaire de l'homme ou du singe.

D'autres tissus humains non embryonnaires ont été employés occasionnellement par Weller, Robbins et Enders [6], Smith et coll. [2], Milzer et coll. [7] et par d'autres encore, avec des résultats très inconstants, variables suivant les auteurs. En particulier, Smith et ses collaborateurs n'ont pas réussi à cultiver *in*

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 6 février 1953.

(\*\*) Boursier de l'Organisation Mondiale de la Santé.

*vitro* sur les amygdales humaines le virus du type Lansing ; ils rapportent 3 résultats douteux et 27 négatifs. Nous avons été plus heureux, et nous avons obtenu la culture du virus poliomyélite en *vitro* sur des tissus humains adultes, en particulier le tissu amygdalien, avec des résultats qui ont été brièvement rapportés ailleurs [8].

Le but de notre travail a été non seulement d'éclaircir les causes des échecs comme de préciser les conditions dans lesquelles le virus de la poliomyélite peut proliférer régulièrement dans les cultures de tissu humain adulte, mais encore d'ouvrir la voie à des applications pratiques de la culture des tissus aux recherches cliniques sur la poliomyélite que la nature des seuls tissus jusqu'ici reconnus sensibles restreignait nécessairement à des laboratoires privilégiés.

La fréquence des amygdalectomies dans la pratique médicale fait de l'amygdale l'un des tissus humains le plus aisément accessible au laboratoire, et l'intérêt de son emploi était, de ce fait, évident.

Or, nous avons vu qu'il est possible, à partir de ce tissu, d'obtenir facilement des cultures bactériologiquement stériles, abondantes et vivaces, de fibroblastes ou d'épithélium humain. Si l'on respecte les règles précises de culture que nous avons établies, le tissu tonsillaire humain peut être utilisé couramment pour la culture des virus de la poliomyélite appartenant aux trois types antigéniques connus.

#### MATÉRIEL ET TECHNIQUE.

**TISSU.** — Le matériel tissulaire que nous utilisons provient des hôpitaux et cliniques de Paris (1) et est prélevé à l'occasion d'interventions chirurgicales courantes (pour les recherches rapportées dans ce travail : amygdales, 17 cas ; tissu cellulomusculaire sous-cutané, 2 cas ; tissu artériel, 2 cas).

Ce matériel, transporté au laboratoire et gardé à + 4° C sans addition de solution physiologique, est mis en culture dans les vingt-quatre heures qui suivent son prélèvement. Nous prélevons aux ciseaux fins le tissu à explanter dans l'épaisseur de l'amygdale, en évitant le parenchyme avoisinant la capsule. Des fragments de 2 à 3 mm<sup>2</sup> sont mis, à raison de 8 par tube, dans des tubes en verre Pyrex de 160 × 16 mm sur une couche mince de plasma de poule, coagulé à l'aide de 1 goutte de milieu composé comme il est dit ci-après. Lors de l'explantation nous

(1) Nous exprimons ici notre vive reconnaissance aux Drs J. Furiet-Lafforet, Y. Cachin, G. Gandon et V. Drouhet pour l'aide qu'ils nous ont apportée en facilitant l'obtention du matériel tissulaire.

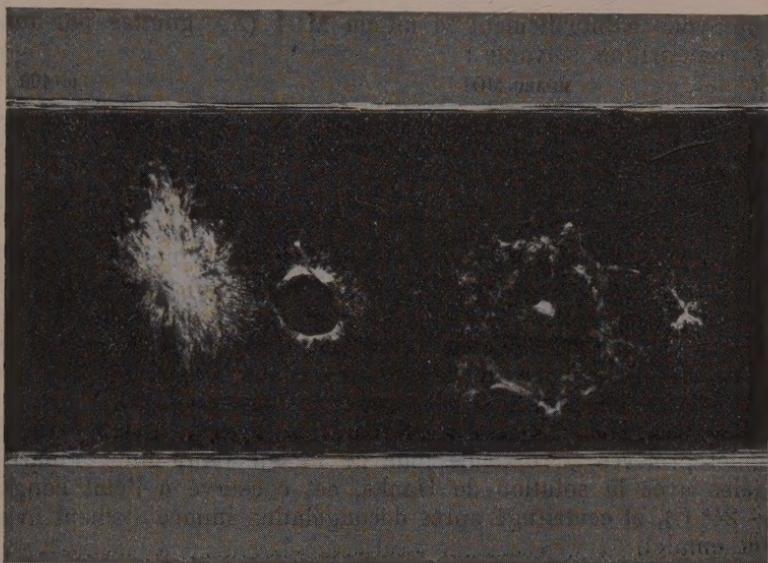


FIG. 1. — Aspect à la loupe d'un tube de culture portant plusieurs colonies de cellules explantées de l'amygdale humaine. De gauche à droite : culture proliférante de fibroblastes; culture cellulaire mixte ayant digéré le plasma coagulé; culture de tissu épithéial.



FIG. 2. — Témoin (culture non infectée). Culture 1170 (amygdale A VIII), dix-huitième jour de la culture; état de la culture témoin trois jours après l'introduction du virus dans les tubes parallèles. Prolifération abondante des fibroblastes.

employons habituellement le milieu MO1 (XX gouttes par tube) de composition suivante :

MILIEU MO1	p. 100
Sérum placentaire humain . . . . .	20
Sérum de cheval normal décomplémenté . . . . .	15
Extrait embryonnaire . . . . .	15
Sérum ultrafiltré . . . . .	45
Solution de Hanks. . . . .	35

Ce milieu est additionné de pénicilline (1 000 unités par millilitre) et de streptomycine (250 µg par millilitre).

Le sérum ultrafiltré est du sérum de cheval ou de bovidé préparé selon la technique de Simms et Sanders [9]. Après l'avoir fabriqué nous-mêmes au laboratoire, nous avons adopté, avec d'excellents résultats une préparation commerciale (2).

L'extrait embryonnaire provenant de broyat d'embryons de poulet prélevés au dixième jour de l'incubation, dilué à parties égales avec la solution de Hanks, est conservé à l'état congelé ( $-24^{\circ}\text{ C}$ ), et centrifugé après décongélation immédiatement avant son emploi.

La solution de Hanks que nous employons ne diffère pas de la formule classique [10], mais nous avons simplifié son mode de préparation (3).

(2) Sérum ultrafiltré préparé par les Laboratoires Renard, 32, rue Henri-Barbusse, Clichy (Seine).

(3) *Préparation de la solution de Hanks :*

1° Préparer séparément les solutions suivantes :

#### *Solution A :*

NaCl. . . . .	80 g
KCl . . . . .	4 g
MgSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O . . . . .	2 g
CaCl <sub>2</sub> . . . . .	1,4 g

Dissoudre successivement les sels dans de l'eau bidistillée, puis compléter avec eau bidistillée jusqu'à 500 cm<sup>3</sup>.

Autoclaver pendant dix minutes.

#### *Solution B :*

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 12 H <sub>2</sub> O. . . . .	1,5 g (ou Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2 H <sub>2</sub> O : 0,6 g)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . . . . .	0,6 g
Glucose . . . . .	10,0 g

Compléter avec de l'eau bidistillée jusqu'à 400 cm<sup>3</sup>. Ajouter 100 cm<sup>3</sup> de solution de rouge de phénol à 0,1 p. 100 et stériliser à la vapeur fluente (autoclave ouvert).

2° Pour obtenir la solution de Hanks concentrée :

Mélanger les deux solutions, filtrer sur filtre de Seitz ou de Schott, conserver à la glacière (+ 4° C).

Les tubes renfermant les explants adhérant à leur paroi après coagulation du plasma et additionnés de milieu liquide sont bouchés avec des bouchons en caoutchouc gris, placés dans un appareil approprié pour la culture en tubes roulants (4) faisant 6 tours par heure, et maintenus dans une étuve à 36° C.

Après sept à dix jours dans le milieu MOI nos cultures sont transférées dans le milieu M1, composé comme suit :

MILIEU M1	P. 100
Sérum de cheval normal décomplémenté . . . . .	25
Sérum ultrafiltré . . . . .	10
Extrait embryonnaire de poulet . . . . .	15
Solution de Hanks . . . . .	50

Le milieu est additionné en outre de pénicilline (200 unités par millilitre) et de streptomycine (50 µg par millilitre).

Pour certaines expériences de contrôle et de vérification nous avons employé, parallèlement aux cultures de tissus humains adultes, des cultures de fibroblastes humains d'origine embryonnaire (souche EH<sub>1</sub>) maintenues dans les mêmes milieux et entretenues dans les mêmes conditions.

**VIRUS.** — Nous avons utilisé pour nos essais, et utilisons couramment depuis :

D'une part, trois souches de culture qui nous ont été aimablement remises par le Dr J. E. Salk et qui, répondant aux trois types antigéniques du virus poliomyélitique, se comportent mieux dans les conditions de la culture *in vitro* que les souches-types Brunhilde, Lansing et Leon, plus adaptées au singe par de nombreux passages sur cet animal. Ce sont les souches suivantes :

Type I : souche Mahoney.

Type II : souche MEF<sub>1</sub>.

Type III : souche Saukett.

3<sup>e</sup> Pour obtenir la solution de Hanks finale, préparer à l'avance la

#### *Solution C :*

NaHCO <sub>3</sub> . . . . .	1,4 g
Eau bidistillée . . . . .	100 ml

On mélange une partie de solution de Hanks concentrée avec neuf parties d'eau bidistillée stérile.

A 100 cm<sup>3</sup> de ce mélange on ajoute 2,5 cm<sup>3</sup> de solution C au moment de l'emploi.

(4) Un dispositif fabriqué industriellement sur nos indications par la Maison Fred Imbert, 20, boulevard Saint-Denis, Paris (X<sup>e</sup>), nous a donné entière satisfaction par sa commodité de manipulation et la régularité de son fonctionnement.

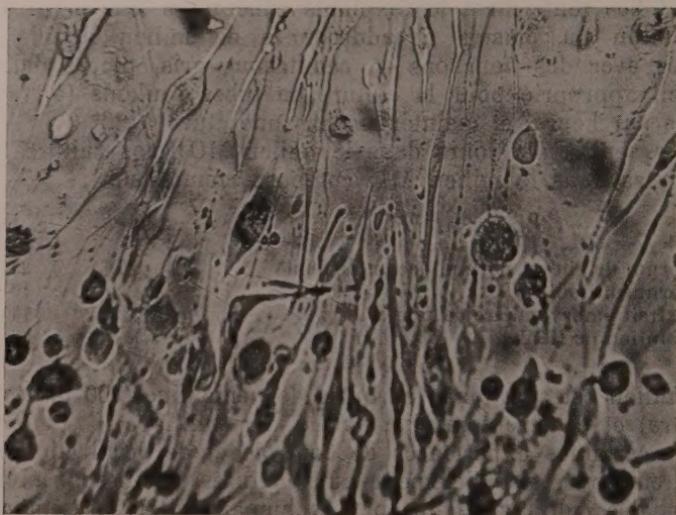


FIG. 3. — Culture cellulaire infectée par le virus Même souche de cellules que la figure 2. Etat de la culture quarante heures après l'introduction du virus MEF1. Dégénérescence et nécrose déjà très accusées des fibroblastes.



FIG. 4. — Même tube que la figure 3. Aspect de la culture trois jours après l'introduction du virus poliomyélitique souche MEF1. Nécrose et destruction de tous les fibroblastes.

D'autre part, trois souches prises parmi celles isolées au laboratoire.

Ce sont des souches qui ont pour origine de l'isolement en culture : 51673 : Moelle de singe (du singe 87), deuxième passage, provenant d'un cas de poliomyélite chez un enfant de 4 ans, avec infection mixte par le virus coxsackie type II. L'extrait des matières fécales a été inoculé à un premier singe (n° 74) qui a succombé en cinq jours, puis à un deuxième singe (n° 87) qui a succombé le neuvième jour avec



FIG. 5. — Culture de contrôle avec virus neutralisé. Même souche de cellules que les figures précédentes. Le virus MEF1 introduit dans la culture a été préalablement incubé avec le sérum d'un individu possédant des anticorps pour le type II du virus poliomyélitique. Etat de la culture sept jours après l'introduction du virus neutralisé. Nombreux fibroblastes normaux et vivaces. Aspect comparable à celui du témoin figure 2.

des lésions typiques de poliomyélite, sans présence de virus coxsackie.

51819 : Extrait de matières fécales d'un enfant de 2 ans atteint de poliomyélite (passage positif sur le singe n° 90).

51879 : Extrait de matières fécales d'un enfant de 6 ans atteint de poliomyélite (avec passage positif sur le singe n° 88, pas de coxsackie associée).

Nous employons pour les passages du virus le surnageant des cultures conservé à — 24° C. Si le virus appartient au groupe II, il est titré sur souris inoculées par voie intracérébrale.

Les cultures cellulaires sont infectées en les faisant incuber

pendant une heure à la température ambiante avec II gouttes de suspension virulente, non diluée ou diluée au 1 : 5 avec la solution de Hanks.

Pour établir la présence d'anticorps neutralisant dans les sérum de certains individus donneurs de tissus, nous incubons un mélange à parties égales de suspension virulente et du sérum étudié pendant une heure à 37° C. Une suspension témoin de virus est incubée de même avec du sérum de cheval. Tous les sérum sont préalablement décomplémentés (une heure à 56° C).

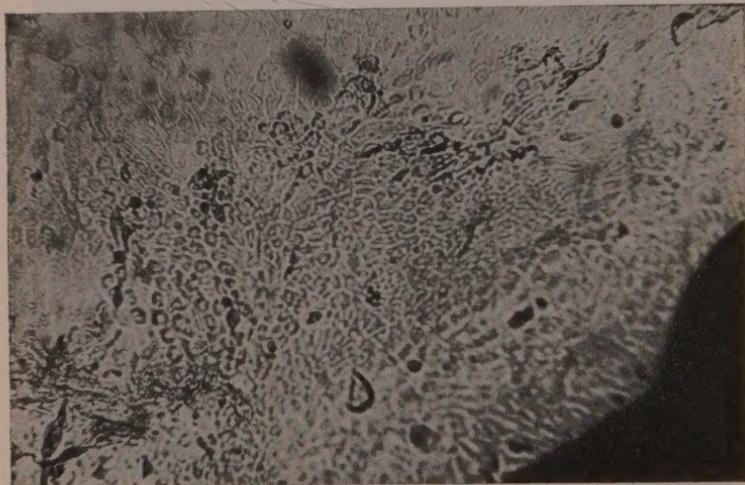


FIG. 6. — Résistance des cellules épithéliales au virus. Culture 1184. Vingt-cinquième jour de la culture. Aspect dix jours après l'introduction du virus poliomyélitique (souche MEF1). Les colonies de fibroblastes dans le même tube sont entièrement détruites. Les cellules épithéliales subsistent malgré la présence du virus.

Nous procédons d'une façon analogue pour déceler des anticorps neutralisants existant dans les extraits d'amygdales. Ces extraits sont préparés par broyage au mortier des fragments finement découpés d'amygdales, suivi d'une extraction avec une quantité égale de solution de Hanks pendant vingt-quatre heures à + 4° C et d'une centrifugation à 5 000 t/min. pendant quinze minutes.

#### RÉSULTATS.

Au cours d'une première série d'expériences nous avons utilisé des cultures de tissu cellulo-musculaire sous-cutané prélevé, d'une part chez un garçon de 14 ans (souche cell. H1) et, d'autre

part, chez une fillette de 6 ans (souche cell. H2). Les virus MEF1 et 51673 ont été introduits dans ces cultures seize jours après l'explantation (soit seize jours : dix jours en MO1 + six jours en M1); c'est-à-dire au moment où elles présentent une croissance fibroblastique abondante. Ces virus ont entraîné une destruction rapide de tous les éléments cellulaires ; cette destruction a été complète en trois jours avec le virus MEF1 et en quatre jours avec le virus 51673.

Les résultats du titrage sur souris du liquide surnageant des cultures de la souche cellulaire H1 avec le virus MEF1 sont rapportés ci-dessous (tableau I).

TABLEAU I.

SURNAGEANT DE CULTURE	DILUTIONS		
	$10^{-4}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$
Troisième jour . . . .	5/5	5/5	4/5
Sixième jour . . . .	5/5	5/5	3/5
Neuvième jour . . . .	4/5	2/5	0/5

La virulence du surnageant du troisième et du sixième jour de ces cultures dépasse celle du matériel virulent originel (limite  $10^{-2}$ ).

Dans toutes les autres expériences, sauf quelques essais également positifs effectués sur cultures d'artères humaines, nous nous sommes servis d'explants d'amygdales humaines.

Nous avons explanté au total 17 amygdales prélevées chez des individus âgés de 5 à 25 ans. Dans 2 cas seulement nous nous sommes trouvés lors de la culture *in vitro*, en présence d'une infection microbienne généralisée des cultures non maîtrisée par les antibiotiques présents dans le milieu. Dans tous les autres cas les cultures ont été bactériologiquement stériles. Certaines d'entre elles, suivies depuis cinq mois, ont fourni au cours de nombreux repiquages des centaines de cultures secondaires dans un milieu contenant seulement 200 U. de pénicilline et 50 µg de streptomycine par centimètre cube.

Après l'explantation des fragments d'amygdales, on observe une migration abondante des leucocytes, suivie après trois ou quatre jours d'un début de croissance de fibroblastes ou d'épithélium provenant des cryptes de l'organe, accompagnés de quelques macrophages. La digestion du plasma, surtout en présence d'épithélium, est très rapide, et pour établir des cultures très proliférantes, il est nécessaire de les recoller (méthode dite du « patching ») souvent avec du plasma neuf.

Au bout de huit à dix jours les caractères de croissance se précisent : certains fragments donnent des plages épithéliales avec de rares fibroblastes, ces plages atteignent quelquefois plus de 10 mm de diamètre. D'autres fragments donnent naissance à une croissance fibroblastique pure, parfois très dense. Il est rare d'observer une prolifération mixte d'épithélium et de fibroblastes. Il est ainsi facile d'établir par la suite, à l'aide de transplantations sélectives et successives, des souches pures de fibroblastes ou d'épithélium.

C'est ainsi que nous avons isolé, et continuons à entretenir dans notre laboratoire depuis plusieurs mois, trois souches de fibroblastes d'origine tonsillaire : les souches A II, A III et A VI provenant d'individus âgés respectivement de 5, 5 et 25 ans. Ces souches, maintenues en tubes roulants sur milieu MO1, prolifèrent assez rapidement pour permettre de procéder tous les quinze jours à un repiquage qui double le nombre de cultures.

La présence du sérum placentaire humain dans le milieu MO1 empêche, comme nous l'avons vu, la prolifération du virus. Mais il suffit de transférer les cultures pendant quarante-huit heures dans le milieu M1 pour les rendre entièrement sensibles à l'action du virus.

Dans la première série d'amygdales (3 individus âgés de 5 à 7 ans) l'introduction du virus (souche MEF1) après seize jours de culture préliminaire a engendré dans toutes les cultures une destruction des fibroblastes qui devint complète en trois jours. En revanche, l'épithélium ne fut détruit que partiellement, surtout à la périphérie des cultures et avant tout dans les tubes où se trouvaient, outre cet épithélium, de nombreuses colonies de fibroblastes.

Le titrage sur souris du surnageant des cultures de cette série a donné les résultats figurant au tableau II.

TABLEAU II.

SURNAGEANT DES CULTURES A 560-583	DILUTIONS			
	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>
Troisième jour . . . . .	3/3	3/3	3/3	3/3
Sixième jour . . . . .	3/3	3/3	2/3	1/3
Neuvième jour . . . . .	3/3	3/3	0/3	1/3

Comme nous le voyons, l'apparition massive du virus dans le liquide surnageant suit de près l'apparition des lésions cellu-

liaires, mais le virus continue à se dégager longtemps encore des cellules apparemment mortes.

Le titrage sur souris nous a montré également que le virus introduit dans des tubes témoins, maintenu dans les mêmes liquides et les mêmes conditions, mais *sans tissu*, disparaît entièrement au bout de trois jours.

Dans une série ultérieure de cultures d'amygdales provenant de 5 individus (âgés de 4 à 5 ans) nous avons introduit le virus (souche MEF1) comme précédemment dans des cultures bien établies âgées de quinze à vingt jours et montrant une croissance abondante de fibroblastes et d'épithélium. Trois à quatre jours après, les fibroblastes étaient détruits totalement, et cela presque simultanément dans toutes les cultures. Les surfaces épithéliales se désintègrent, mais il subsiste très souvent une marge de cellules vivantes à proximité du fragment. Cette marge peut même s'élargir. *Une croissance épithéliale limitée est donc possible en présence du virus.* Ce fait est confirmé par l'observation des changements de pH du milieu de culture. Dans les cultures de fibroblastes rapidement détruites par le virus, le pH s'élève aussitôt à 7,6-7,8. Par contre, dans les tubes sélectionnés présentant une croissance épithéliale abondante et d'où nous avons éliminé les colonies fibroblastiques, le pH continue à s'abaisser après chaque renouvellement du milieu, prouvant ainsi que le métabolisme continue dans ces tubes en dépit de la présence du virus.

Le titrage sur souris confirme ces observations : le surnageant du troisième au sixième jour de cultures de la série A I marquée par une croissance fibroblastique riche tue 4 souris sur 4 à la dilution  $10^{-2}$  et 2 sur 4 à la dilution de  $10^{-3}$ , tandis que le surnageant de tubes parallèles présentant une croissance épithéliale particulièrement riche, mais sans fibroblastes, est négatif à  $10^{-1}$ . Tous les titrages effectués avec d'autres séries ont confirmé de façon frappante le *parallelisme existant entre la prolifération des fibroblastes et le taux de virulence final de la culture.*

La virulence du virus MEF1 pour les fibroblastes humains en culture et pour la souris, au cours de 10 passages successifs sur une souche de fibroblastes d'origine tonsillaire (A V) n'a pas diminué et a même montré une tendance à augmenter.

Dans les séries suivantes (A VI, A VII, A VIII, A IX et A X) nous avons explanté des tissus tonsillaires provenant de 5 individus âgés respectivement de 25, 14, 4, 6 et 25 ans. Dans cette série d'expériences, nous avons utilisé, parallèlement à la souche MEF1 (type II), des souches de deux autres types.

Les cultures de chacune de ces séries ont été partagées en deux lots. Le premier comportait 4 groupes de fragments tissulaires incubés avant la mise en culture pendant une heure dans

TABLEAU III.

DONNEUR ET ANTICORPS	CULTURES DU VIRUS SUR AMYGDALES								
	JOURS	1	5	7	10	14	15	17	18
		▼ VIRUS					↓ VIRUS		
A VI D.. 25 ANS	Mah	+	+						
SÉRUM:	Mah	0	±	±	±	+			
I = +	MEF	+	+						
II = ++	MEF	+	+						
III = +	Sauk	0	0	0	0	0			
AMYGDALE:	Sauk	±	±	±	±	+			
I = 0	—	0	0	0	0	0	Mah		+
II = 0	—	0	0	0	0	0	Mah		+
III = 0	—	0	0	0	0	0	MEF		+
	—	0	0	0	0	0	MEF		+
	—	0	0	0	0	0	Sauk		+
	—	0	0	0	0	0	Sauk		+
A VII B.M. 14 ANS	Mah	0	0	0	0	0	ÉLIMINÉ (INFECTION BACTÉRIENNE)		
SÉRUM:	Mah	0	0	+	+	+			
I = ++	MEF	0	0	0	0	0	MEF	+	
II = 0	MEF	0	±	+					
III = +++	Sauk	0	0	0	0	0	Sauk	±	+
AMYGDALE:	Sauk	0	0	0	0	0	Sauk	±	+
I = 0	—	0	0	0	0	0	Mah	+	
II = 0	—	0	0	0	0	0	MEF	±	+
III = +	—	0	0	0	0	0	Sauk	+	
A VIII B.. M. 4 ANS	Mah	0	0	+	0	0	Mah	±	+
SÉRUM:	Mah	0	0	0	0	0	Mah	+	
I = +++	MEF	0	0	+			MEF	+	
II = 0	Sauk	0	0	0	0	0	Sauk	±	+
III = +++	Sauk	0	0	0	0	0	Sauk	±	+
AMYGDALE:	—	0	0	0	0	0	Mah	±	+
I = ++	—	0	0	0	0	0	MEF	+	
II = 0	—	0	0	0	0	0	MEF	+	
III = ±	—	0	0	0	0	0	Sauk	±	+
A IX R.F. 6 ANS	Mah	0	0	0	0	0	Mah	+	
SÉRUM:	Mah	0	0	0	0	0	MEF	±	+
I = 0	MEF	0	0	0	0	0	MEF	+	
II = 0	Sauk	0	0	0	0	0	Mah	+	
III = 0	Sauk	0	0	0	0	0	MEF	+	
AMYGDALE:	—	0	0	0	0	0	MEF	+	
I = 0	—	0	0	0	0	0	Sauk	±	+
II = 0	—	0	0	0	0	0	Sauk	±	+
III = 0	—	0	0	0	0	0	Sauk	±	+
A X R.M. 25 ANS	Mah	0	0	0	0	0	Mah	+	
	MEF	0	0	0	0	0	MEF	+	
	MEF	0	0	0	0	0	MEF	+	
	Sauk	0	±	+					
	—	0	0	0	0	0	Mah	+	
	—	0	0	0	0	0	Mah	±	
	—	0	0	0	0	0	MEF	+	
	—	0	0	0	0	0	Sauk	+	

des suspensions des virus appartenant aux trois types, le quatrième groupe servant de témoin. Toutes ces cultures ont été mises d'emblée en milieu M1 (sans sérum placentaire humain). Le second lot a comporté pour chaque série des cultures parallèles en milieu MO1 avec fragments non incubés avec le virus.

Comme nous le voyons dans le tableau III, l'introduction du virus dans les cultures d'amygdales au moment de l'explantation a donné des résultats très irréguliers. L'effet destructif du virus, s'il se manifeste, apparaît toujours avec un retard allant jusqu'à dix jours, tandis que la plupart des cultures résistent à l'infection et ne se distinguent en rien des témoins sans virus. Cette irrégularité ne semble tenir ni à l'âge du donneur du tissu, ni à la souche du virus inoculé, ni même à la présence d'anticorps dans le sérum ou le tissu tonsillaire du donneur. En effet, le tissu A X résiste entièrement aux virus des groupes I et III, bien que le donneur ne possède point d'anticorps humoraux ou tissulaires pour aucun des trois types antigéniques connus de poliomycélite. Nous observons le contraire dans la série A II où le tissu se montre relativement susceptible aux trois virus malgré la présence d'anticorps chez son donneur.

Si, au bout de quinze jours, nous introduisons de nouveau le virus (représenté par les mêmes suspensions virulentes conservées dans l'intervalle à  $-24^{\circ}\text{ C}$ ) dans les mêmes tubes respectivement, les cultures sont détruites cette fois régulièrement et entièrement en deux ou trois jours. De même le lot parallèle de cultures qui a été précultivé sans virus pendant quinze jours en milieu MO1 d'abord et ensuite en milieu M1 réagit pour toutes les 5 séries, comme dans les expériences précédentes, très rapidement : les cellules sont détruites entièrement en deux ou trois jours, et cela est vrai quel que soit le type de virus.

Ajoutons enfin que l'isolement du virus poliomycélitique directement à partir de matières fécales humaines sur des cultures d'une lignée de fibroblastes tonsillaires et sans passer préalablement par le singe, nous a permis, au cours de ces essais,

TABLEAU III.

Résultats de l'introduction des virus appartenant aux trois types antigéniques de la poliomycélite (type I, souche Mahoney ; type II, souche MEFL ; type III, souche Saukett) dans les cultures cellulaires à partir d'amygdales provenant de cinq individus.

Le virus est introduit dans la culture à deux reprises, le premier et le quinzième jours. Action sur les cellules :

O : culture normale ;  $\pm$  : destruction partielle des cellules ; + : destruction cellulaire complète.

Les anticorps ont été recherchés par réaction de neutralisation, chez les donneurs de tissu, dans le sérum et dans l'extrait d'amygdales (+++ : inhibition totale du virus ; ++, + et  $\pm$  ; inhibition partielle se manifestant par un retard plus ou moins important dans la destruction cellulaire).

d'isoler deux souches du virus dont l'étude fera l'objet d'un autre travail. Les deux souches ainsi isolées dépassent par leur virulence pour les cultures de fibroblastes humains adultes [lignées fibroblastiques A II, A III (enfants), A VI (adulte) et AR (Artère d'adulte)], les trois souches de Salk déjà entraînées à la culture *in vitro*.

#### DISCUSSION ET CONCLUSION.

Il ressort de nos expériences que le tissu humain adulte, le tissu tonsillaire en particulier, se prête bien à la culture des virus poliomyélitiques appartenant aux trois types antigéniques connus.

Cependant, le tissu ne peut être utilisé dans ce but qu'après avoir été préalablement cultivé dans un milieu approprié et qui lui assure des conditions optimum de prolifération cellulaire. Ainsi s'expliquent les échecs de Smith, Chambers et Evans [2] qui introduisaient (comme nous l'avons également fait dans certaines de nos séries de cultures et avec le même résultat) le virus au départ de la culture.

Il est parfaitement concevable qu'au cours d'une culture préliminaire le tissu explanté subisse une transformation profonde. On peut admettre qu'il perd ainsi les anticorps qu'apporte avec lui l'explant provenant d'un organisme adulte. Mais cette explication ne nous paraît pas, à elle seule, suffisante à la lumière des réactions de neutralisation, qui ne montrent aucune concordance entre la résistance du tissu tonsillaire fraîchement explanté et la présence d'anticorps tissulaires ou humoraux. Rappelons également à ce propos que Ledinko et Melnick [11] ont pu récemment cultiver le virus de la poliomyélite sur testicules de singes immunisés.

Les causes de la différence entre le comportement envers le tissu adulte frais et du même tissu cultivé *in vitro* pendant deux à trois semaines sont à rechercher, à notre avis, avant tout dans la transformation fondamentale que subit un tissu adulte incité artificiellement *in vitro* à une prolifération rapide, intense et illimitée. Les cultures cellulaires qui en dérivent sont profondément différentes des fragments tissulaires histologiquement organisés venant de l'organisme. A cet égard, il convient de souligner accessoirement que l'atteinte des cellules du tissu conjonctif par le virus de la poliomyélite n'a jamais été observée *in vivo*, en particulier chez l'homme.

Il apparaît donc essentiel pour la culture *in vitro* du virus poliomyélitique sur tissu adulte d'origine humaine que ce dernier ait préalablement abandonné l'équilibre statique physiologique qui le caractérise *in vivo* pour passer au stade dynamique de

prolifération intense qui traduit son adaptation aux conditions particulières prévalant *in vitro*.

L'emploi d'un milieu du type MO1 à base de sérum placentaire humain, de sérum ultrafiltré et d'extrait embryonnaire paraît parfaitement convenir à la création des conditions nécessaires à cette transformation. Le milieu M1, à base de sérum de cheval et dépourvu de sérum homologue, y est moins favorable. La croissance dans ce milieu est plus pauvre et les cellules montrent souvent des signes de souffrance. Par contre, la présence de sérum de cheval dans le milieu MO1 est bien tolérée. Les tissus humains précultivés dans ce milieu tolèrent par la suite beaucoup mieux le milieu M1 entièrement hétérologue.

Le milieu MO1 peut servir comme milieu pour la culture prolongée des fibroblastes provenant des amygdales humaines. Depuis six mois nous cultivons dans ce milieu plusieurs lignées cellulaires d'origine amygdalienne tout en doublant tous les quinze à vingt jours le nombre des cultures par transplantation. Au cours de ces repiquages, la sensibilité des cellules à l'action destructrice du virus est restée entière, et la récolte du virus dans le liquide surnageant des cultures est demeurée constante.

Outre l'intérêt théorique majeur que nos observations apportent au problème de la multiplication *in vitro* du virus poliomyélitique, il est inutile d'insister sur les applications pratiques, en particulier au diagnostic de la poliomyélite et à la réalisation d'enquêtes épidémiologiques, qui peuvent résulter de la mise en œuvre d'une méthode simple de culture n'exigeant comme substrat cellulaire qu'un tissu d'origine humaine particulièrement facile à obtenir et spécialement propice à la croissance du virus.

La résistance relative qu'opposent aux virus de la poliomyélite les cellules épithéliales d'origine tonsillaire constitue un fait nouveau auquel il nous est difficile de donner à l'heure actuelle une interprétation définitive. Ceci est d'autant plus frappant que les fibroblastes des mêmes cultures sont détruits régulièrement en deux à quatre jours jusqu'à la dernière cellule. Il faut en retenir que l'histotropisme sélectif du virus poliomyélitique paraît être différent *in vitro* de ce qu'il est *in vivo*. Il y a là un point intéressant à retenir pour l'étude des rapports cellule-hôte.

#### RÉSUMÉ.

1<sup>o</sup> Le tissu amygdalien, provenant d'individus âgés de 5 à 25 ans, explanté *in vitro* en tubes roulants dans un premier milieu approprié donne au bout de dix à quinze jours une prolifération abondante de fibroblastes et d'épithélium. Un milieu de culture spécial à base de sérum placentaire humain, de sérum de cheval, de sérum ultrafiltré et d'extrait embryonnaire avec addition

d'antibiotiques est particulièrement propice à ce développement.

2° Le transfert des explants dans un deuxième milieu sans sérum humain permet d'utiliser les fibroblastes de néocroissance pour la culture du virus poliomyalitique. Le virus de la poliomyalite, quel que soit son type antigénique, introduit dans ces cultures, prolifère régulièrement et entraîne une destruction des fibroblastes en deux ou trois jours.

3° Par contre le même virus introduit au moment de la mise en culture des fragments d'amygdales n'attaque les cellules que très irrégulièrement et très incomplètement.

4° Il n'y a pas de rapport apparent entre la présence chez le donneur d'anticorps neutralisants humoraux et tissulaires et la résistance relative au virus du tissu frais.

5° L'épithélium des cryptes amygdaliennes en croissance *in vitro* se montre bien plus résistant au virus que les fibroblastes.

6° Les cultures de fibroblastes provenant du tissu sous-cutané musculaire adulte se comportent envers le virus d'une façon analogue aux fibroblastes d'origine amygdalienne.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. F. ENDERS, T. H. WELLER et F. C. ROBBINS. *Science*, 1949, **109**, 85. — J. F. ENDERS. In *Poliomyelitis*, Papers and discussions presented at the Second International Poliomyelitis Conference, Lippincott, 1952, p. 33.
- [2] W. M. SMITH, V. C. CHAMBERS et G. A. EVANS. *Northwest Med.*, 1950, **49**, 368.
- [3] J. T. SYVERTON, W. F. SCHERER et G. BUTORAC. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1951, **77**, 23.
- [4] J. S. YOUNGER, E. N. WARD et J. E. SALK. *Am. J. Hyg.*, 1952, **55**, 291 et 301.
- [5] N. LEDINKO, J. T. RIORDAN et J. L. MELNICK. *Am. J. Hyg.*, 1952, **55**, 323.
- [6] T. H. WELLER, F. C. ROBBINS et J. F. ENDERS. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1949, **72**, 143.
- [7] A. MILZER, S. O. LEVINSON, K. VANDERBOOM et Ph. ADELMAN. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1950, **74**, 136.
- [8] P. LÉPINE, G. BARSKI, G. DE BRION et V. MONACI. *C. R. Acad. Sci.*, 1953, **236**, 154.
- [9] H. S. SIMMS et H. SANDERS. *Arch. Pathol.*, 1942, **33**, 619.
- [10] J. H. HANKS et R. E. WALLACE. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1949, **74**, 197.
- [11] N. LEDINKO et J. L. MELNICK. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1952, **81**, 144.

## **NUMERATION DES UNITÉS BACILLAires VIABLES DES SUSPENSIONS DU VACCIN BCG**

par MAURICE PANISSET et BERNARD MARCIL (\*)

(*Institut de Microbiologie et d'Hygiène, Service des Recherches.  
Ecole d'Hygiène, Service de Microbiologie.  
Université de Montréal.*)

La stabilité des propriétés biologiques des suspensions de *Mycobacterium tuberculosis* var. *BCG* utilisées pour la vaccination a été recherchée dans l'observance minutieuse des prescriptions techniques de Calmette et Guérin [3, 4].

Une expérience de près d'un quart de siècle, basée sur des conditions précises de culture et des pratiques hebdomadaires scrupuleusement suivies, permettait d'évaluer *a priori* le poids d'un voile de quatorze ou de vingt et un jours, des pesées répétées n'ayant jamais accusé, dans ces conditions invariables, que de minimes écarts d'un lot à l'autre.

Ces critères, que d'aucuns peuvent juger quelque peu sommaires, n'en ont pas moins permis de préparer pendant plus de vingt ans, pour des dizaines de milliers de sujets, un vaccin possédant une remarquable fixité de ses propriétés biologiques. Cette stabilité a été analysée par A. Frappier [15] dans son rapport au IV<sup>e</sup> Congrès International de Médecine tropicale et de Malaria.

Néanmoins, l'évaluation purement pondérale de la masse bacillaire a cessé d'être une donnée suffisante d'appréciation des propriétés biologiques du vaccin lorsqu'on a entrepris de le conserver à l'aide de la lyophilisation : il devenait, en effet, nécessaire de connaître les proportions respectives des éléments viables et non viables dans des échantillons comparables, examinés avant et après lyophilisation, d'apprécier les effets de temps divers de conservation, dans des conditions déterminées. Vers la même époque, René Dubos, dans un éditorial de l'*American Review of Tuberculosis* [11], faisait une critique sévère des échantillons de *BCG* qui lui avaient été soumis par divers labo-

(\*) Travail exécuté avec l'aide du Ministère de la Santé de la Province de Québec (Subventions fédérales-provinciales aux recherches sur la Santé publique).

ratoires des Etats-Unis. Sur la foi de ses expertises, il affirmait que l'examen bactérioscopique, l'appréciation du « poids sec » révélaient de larges variations entre des échantillons de diverses origines (de 1 à 5 000 000 000 par millilitre de liquide). Les épreuves de viabilité révélèrent à M. Dubos qu'une très faible proportion des cellules était viable (certains échantillons ne contenaient que 1 cellule viable pour 100 000 cellules mortes) [11, 12].

Notre recherche d'une méthode de mesure de la viabilité relative des suspensions de BCG représente donc une contribution préliminaire, mais essentielle à la mise au point et au contrôle d'une méthode de lyophilisation du BCG. Elle a eu aussi pour but, de voir si les avancées de René Dubos auraient pu s'appliquer au vaccin préparé, depuis de longues années, dans les laboratoires de l'Institut de Microbiologie et d'Ihygiène de l'Université de Montréal et dont un grand nombre d'études nous affirmaient cependant la valeur biologique.

#### LE PROBLÈME DE L'APPRÉCIATION DE LA VIABILITÉ RELATIVE DU VACCIN BCG.

Dans un excellent travail d'ensemble sur l'expertise au laboratoire du vaccin BCG, E. F. Krohn [10] pose, dans les termes suivants, le difficile problème de la détermination des particules bacillaires du BCG. « Tel qu'il est préparé aujourd'hui, le vaccin BCG est une suspension de bacilles isolés et d'agrégats de tailles variées, associés à une proportion variable de détritus, de fragments de bacilles qui ont été écrasés durant le broyage... En raison des larges variations dans les dimensions des particules bacillaires du vaccin BCG, il est impossible de calculer le nombre de ces particules par rapport à une concentration donnée de BCG (poids sec ou humide)... Le degré de dispersion (du vaccin) est important à considérer, en liaison avec les propriétés antigènes du vaccin. »

En somme, le problème est d'évaluer le nombre de particules viables dans le vaccin, tel qu'il est injecté. En effet, la résolution des masses bacillaires en leurs éléments constitutifs ou l'élimination par les procédés usuels (filtration ou centrifugation) de ces agrégats fausserait, dès l'abord, les données du problème : la suspension que l'on injecte et dont il faut apprécier la viabilité renferme des agrégats plus ou moins volumineux, aussi bien que des bacilles.

Il importe donc de souligner que les méthodes de numération des bacilles tuberculeux dans des suspensions spécialement préparées ne peuvent s'appliquer, sans modification, à l'appréciation du vaccin BCG. Dans le premier cas, l'opérateur peut utiliser

divers artifices techniques pour réaliser une suspension homogène, dont la phase dispersée est formée de cellules isolées ou d'amas de quelques bacilles. Dans le deuxième, l'opérateur doit évaluer la viabilité d'une suspension formée de particules hétérogènes quant à leurs dimensions, mais utilisable et utilisée telle quelle comme vaccin.

#### CHOIX D'UNE MÉTHODE.

1<sup>o</sup> NUMÉRATION A L'HÉMATIMÈTRE. — Cette méthode ne répondait pas à nos besoins puisqu'elle ne permet pas de distinguer les éléments viables et non viables. D'autre part, elle ne peut être appliquée qu'au comptage des éléments de suspensions bactériennes formées de cellules séparées.

En observant ces conditions, E. F. Krohn [16] a mis au point une méthode d'appréciation du degré de dispersion du BCG basée sur l'examen du vaccin à l'hématimètre. Son étude critique des diverses techniques employées sera consultée avec fruit.

2<sup>o</sup> ENSEMBLEMENT DE DILUTIONS DÉCIMALES DE BCG EN MILIEU LIQUIDE. — Nous avons réalisé des dilutions en série des suspensions de BCG, dans des séries de tubes, renfermant 4,5 ml de milieux de Sauton, de Proskauer et Beck, puis de milieu de Dubos. Les dilutions étaient poussées de  $10^{-1}$  à  $10^{-10}$ . Malgré le soin apporté à la réalisation des dilutions, à la pipette ou à la seringue, nous avons dû abandonner cette méthode après des centaines d'essais ; il arrivait très souvent (environ une fois sur cinq) qu'un ou deux tubes restassent stériles, alors que les dilutions inférieures et supérieures donnaient une culture. L'interprétation de semblables séries était très difficile. D'ailleurs, en général, les résultats de ces épreuves se prêtent mal à l'interprétation statistique et à l'établissement de moyennes.

Néanmoins, Aronson et Schneider [1], Birkhaug [2] ont étudié la viabilité du vaccin BCG qu'ils produisaient, à l'aide de la méthode des dilutions en milieu de Dubos.

3<sup>o</sup> ENSEMBLEMENT DE DILUTION SUR MILIEUX SOLIDES EN VUE DE LA NUMÉRATION DES COLONIES. — Certaines méthodes cherchent à remédier à quelques-uns des inconvénients de la méthode des dilutions en milieu liquide. Le vaccin est dilué dans un petit volume de milieu liquide, puis un certain volume de chaque dilution estensemencé, en tube de milieu de Löwenstein.

Le tube est mis à l'étuve, des colonies apparaissent, que l'on peut compter, mais en raison de l'exiguïté des surfaces et de la multiplicité des dilutions, des erreurs étendues semblent possibles.

Birkhaug [2] fait la numération des éléments viables de suspensions de BCG en le diluant en série dans des tubes de milieu

liquide, puis en ensemencant 1 ml des dilutions (milligramme de BCG, poids humide)  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ , sur quatre grands tubes de milieu de Löwenstein.

Van Deinse [5, 6] ensemence V gouttes des dilutions (milligramme de BCG, poids humide)  $10^{-4}$  et  $10^{-5}$  sur du milieu de Löwenstein ne contenant que 0,75 p. 100 de glycérine.

Il est bon de rappeler que Calmette [3, 4] fut le premier à appliquer la méthode de numération sur milieu solide à l'étude du BCG.

Plus récemment, Sievers [17], Tolderlund [19], Domingo [9], Dowdeswell [10], Thow [18], Krohn [16] ont publié les méthodes qu'ils emploient pour apprécier la viabilité du vaccin qu'ils produisent. Leurs techniques s'inspirent des travaux de Fenner, Martin et Pierce [13] sur la numération des bacilles tuberculeux.

**Méthode de numération des unités bacillaires viables,  
utilisée à l'Institut de Microbiologie et d'Hygiène  
de l'Université de Montréal.**

Nous avons cherché à éviter les causes d'erreurs que nous avaient révélées une analyse critique des essais antérieurs et nos propres tentatives.

**LA SUSPENSION DILUÉE DE VACCIN  
DOIT ÊTRE AUSSI REPRÉSENTATIVE QUE POSSIBLE.**

Afin d'éviter la sédimentation différentielle des particules de diverses grosseurs, nous avons choisi un liquide de dilution visqueux, l'eau physiologique gélatinée à 5 p. 100.

Le vaccin est agité avant son prélèvement et son addition au liquide de dilution, dans des conditions très précises et qui sont décrites plus bas.

**LES DILUTIONS SONT CAUSES D'ERREURS.  
LEUR NOMBRE DOIT ÊTRE RÉDUIT AU MINIMUM.**

Nos premiers essais nous ont révélé que des dilutions décimales multiples augmentaient les chances d'erreurs. Nous diluons donc le vaccin au 1/100, au 1/10 000, puis au 1/100 000 en utilisant trois bouteilles de 99 ml de solution gélatinée qui reçoivent, chacune, 1 ml du vaccin ou de la dilution précédente.

**STANDARDISATION DES OPÉRATIONS.**

Nos mesures ne peuvent avoir de valeur relative et permettre des comparaisons que si les opérations sont rigoureusement stan-

dardisées. C'est pour cette raison que nous avons adopté une agitation mécanique pour suspendre les dilutions du vaccin ; la durée et la fréquence de l'agitation sont, également, précisées plus loin.

### I. — Technique de numération.

#### MATÉRIEL.

RÉCIPIENTS DESTINÉS A L'ÉCHANTILLON A EXPERTISER ET AUX DILUTIONS. — Bouteilles (1) dites « à dilution » carrées, bouchées avec des bouchons de caoutchouc n° 2.

LIQUIDE DE DILUTION. — Eau physiologique ( $\text{NaCl}$ , 0,85 p. 100), gélatinée à 5 p. 100, stérilisée à  $120^\circ \text{C}$ , pendant trente minutes, répartie aseptiquement à raison de 99 ml, dans les bouteilles de « dilution ».

APPAREIL A AGITATION MÉCANIQUE. — L'appareil utilisé est celui de l'« International Equipment Co ». Numéro du catalogue S-1949, 6222 Size 2 (Bottle shaking machine). Cet appareil agite au rythme de 8 secousses par seconde.

PIPETTES. — Pipettes sérologiques, 1 ml, graduées en centièmes.

MILIEU DE CULTURE. — Milieu de Dubos solide (acide oléique et fraction V de l'albumine bovine). La formule utilisée par Fenner [4] a été modifiée de façon que le volume final soit de 1 000 ml au lieu de 900 ml.

SUITE DES OPÉRATIONS. — Le vaccin est reçu du laboratoire de préparation, à une concentration de 60 mg/ml. Ce vaccin est dilué immédiatement avec le milieu de Sauton au 1/4 après sa préparation et agitation de deux minutes à une concentration de 30 mg/ml.

La suspension-mère ainsi que la dilution à 50 p. 100 sont transportées dans des bouteilles à dilution.

1<sup>o</sup> La suspension de vaccin (30 mg/ml) est agitée dans une bouteille à dilution pendant deux minutes.

2<sup>o</sup> 1 ml de cette suspension est immédiatement porté dans 99 ml de liquide de dilution. La pipette est rincée dix fois par aspiration et refoulement du liquide : la dilution obtenue est de 1/100. Elle est agitée durant cinq minutes sur la machine.

(1) Les bouteilles à dilution sont du type recommandé par Breed de N. Y. State Agricultural Station. Canadian Laboratory supplies Ltd. N° cat. (3-43) A-6-530.

3° 1 ml de cette dilution est porté dans une autre bouteille de dilution, renfermant 99 ml de solution gélatinée. La pipette est rincée cinq fois.

4° Cette bouteille est agitée durant cinq minutes mécaniquement.

5° 1 ml de cette dilution ( $1/10^4$ ) est porté dans une troisième bouteille de dilution renfermant 99 ml de solution gélatinée.

6° Cette troisième bouteille est agitée durant cinq minutes.

7° Quatre boîtes de Petri renfermant du milieu de Dubos à l'acide oléique, fraction V, sont ensemencées sans retard chacune avec 0,1 ml de cette dernière dilution ( $1/10^6$ ). L'inoculum est étalé avec un fil de platine recourbé (fig. 1).

8° Les boîtes sont laissées durant quinze minutes sur la table (gélose dans la partie inférieure) afin de laisser le liquide de suspension pénétrer la gélose.

9° Les boîtes sont scellées avec une bande de parafilm (2) et déposées à l'étuve à  $38^\circ$  pendant trois semaines.

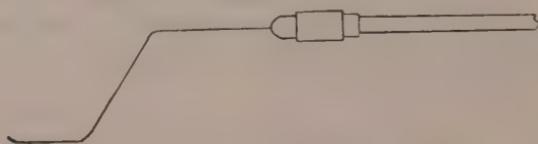


FIG. 1.

10° Les colonies sont comptées à l'aide de l'appareil de M. McCready (3).

11° Le nombre moyen des colonies présentes sur quatre boîtes est multiplié par le facteur de dilution  $10^6$ , puis par 10 (la mesure a eu lieu sur 0,1 ml); le résultat est le nombre d'unités bactériennes viables par centimètre cube.

## II. — Essais ou observations effectués sur les diverses phases de la technique.

a) MENSURATION DU DILUANT. — Au début, le diluant était préparé dans de grands récipients puis réparti dans les bouteilles de dilutions (99 ml par bouteille) avant la stérilisation à l'autoclave. L'expérience a montré qu'après stérilisation le volume contenu dans chaque bouteille était variable. Pour remédier à cette source d'erreurs, on a procédé de la façon suivante : 2 000 ml de diluant

(2) Le « parafilm » est une feuille adhérente à base de paraffine, fabriquée par Marathon products (Grade M).

(3) Quebec bacteria colony counter. Fisher Scientific Co. Ltd.

sont stérilisés dans des bouteilles de 4 l. La répartition dans les bouteilles de dilution se fait aseptiquement, avec une burette de 100 cm<sup>3</sup>.

*b) Toxicité ou Propriété Agglutinante du Diluant.* — Si l'on prolonge le contact du BCG avec le diluant, les valeurs obtenues par la méthode pour un même échantillon diminuent.

Ce fait a été révélé par une expérience que nous avons faite

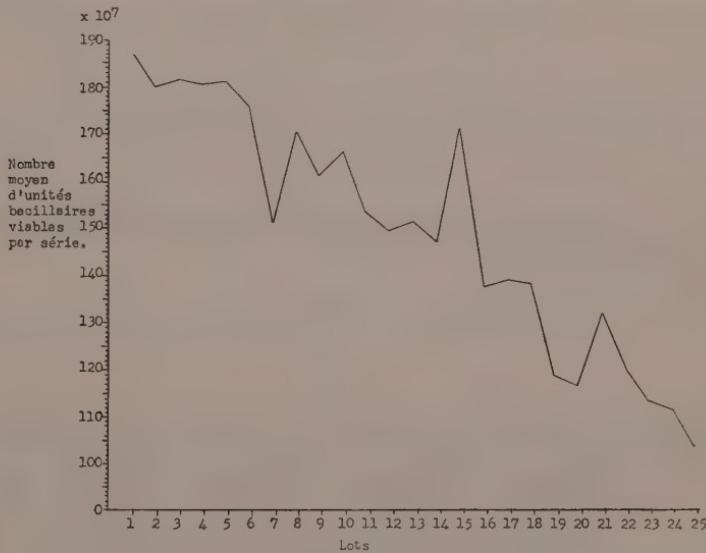


FIG. 2.

*Nombres obtenus (moyennes de 4 ou 3 boîtes de Petri) :*

1 . . . . .	187,7	(3) (1)	10 . . . . .	166,75	(4)	19 . . . . .	118	(3)
2 . . . . .	180,25	(4)	11 . . . . .	154,3	(3)	20 . . . . .	116	(4)
3 . . . . .	182,25	(4)	12 . . . . .	149,75	(4)	21 . . . . .	132	(3)
4 . . . . .	180,7	(3)	13 . . . . .	151,5	(4)	22 . . . . .	120	(4)
5 . . . . .	181,3	(3)	14 . . . . .	147,3	(3)	23 . . . . .	112,7	(3)
6 . . . . .	176	(4)	15 . . . . .	172	(3)	24 . . . . .	111	(3)
7 . . . . .	151	(3)	16 . . . . .	137,25	(4)	25 . . . . .	103	(3)
8 . . . . .	170,7	(3)	17 . . . . .	138,5	(4)			
9 . . . . .	161,5	(4)	18 . . . . .	137,75	(4)			

(1) Nombre de boîtes de Petri qui ont servi à établir la moyenne.

en vue de déterminer les causes d'erreurs de cette méthode de numération du BCG.

La durée du contact des bacilles avec le diluant à la température de la pièce a varié de trois heures pour la première série, à cinq heures pour la dernière (voir fig. 2).

Les résultats de ces essais montrent que les variations du temps de contact du BCG avec le diluant peuvent constituer une importante cause d'erreur. Il peut s'agir soit d'une action toxique du diluant, soit d'un effet agglutinant ou conglomerant de ce diluant sur les unités bacillaires.

Toutes les opérations sont faites à l'abri de la lumière solaire directe, dont le pouvoir bactéricide est bien connu. D'ailleurs, toute la préparation du BCG est faite dans les mêmes conditions.

### III. — Valeurs respectives du milieu de Dubos et du milieu de Löwenstein.

Le tableau I indique les résultats de numérasions faites à l'aide du milieu de Löwenstein et du milieu de Dubos (tableau I, 1<sup>re</sup> et 2<sup>e</sup> colonnes).

TABLEAU I. — Sensibilités comparées du milieu de Löwenstein (3) et du milieu de Dubosensemencés avec du BCG, avant et après lyophilisation.

LOTS	AVANT LYOPHILISATION		APRÈS LYOPHILISATION		POURCENTAGE de survie	
	Löwenstein	Dubos	Löwenstein	Dubos	Löwenstein	Dubos
36 . . . . .	543 000 000	585 000 000	62 400 000	72 000 000	41,4	42,3
37 . . . . .	435 000 000	801 000 000	57 000 000	93 000 000	43,1	41,6
38 . . . . .	699 000 000	714 000 000	51 000 000	61 500 000	7,3	8,6
39 . . . . .	750 000 000	699 000 000	34 500 000	54 900 000	4,6	7,9
40 . . . . .	258 000 000	171 300 000	9 300 000	11 400 000	4,0	6,6
Total. . . . .	2 685 000 000	2 970 300 000	213 900 000	292 800 000	40,4	47,0
Moyenne . . . .	537 000 000	594 060 000	42 780 000	58 560 000	8,08	9,4
Différence de poussée entre les milieux.		+ 57 060 000		+ 15 780 000		
Excédent en faveur du milieu de Dubos :						
	$57\ 060\ 000 \times 100$		$15\ 780\ 000 \times 100$			
	537 000 000		42 780 000			
	10,6 p. 100		36,9 p. 100			

Les valeurs obtenues montrent que, pour des échantillons comparables, le milieu de Dubos est nettement plus sensible.

(3) Le milieu utilisé est la modification du milieu de Löwenstein par Petrik [20].

Néanmoins, il n'est pas sans intérêt de noter que, si l'on compare sur milieu de Löwenstein et sur milieu de Dubos, les teneurs en éléments vivants des mêmes suspensions, avant et après lyophilisation (tableau I, 1<sup>re</sup>, 2<sup>e</sup>, 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> colonnes), on observe de curieuses discordances.

Avant la lyophilisation, le milieu de Dubos donne un nombre de colonies plus élevé de 10,6 p. 100 par comparaison avec le milieu de Löwenstein. Après lyophilisation, le milieu de Dubos donne 36,9 p. 100 de plus de colonies.

Théoriquement, après lyophilisation, le pourcentage devrait être sensiblement égal à 10,6 p. 100.

Il semble donc qu'après lyophilisation, un certain nombre d'unités bactériennes soient inaptes à se développer sur le milieu de Löwenstein tout en demeurant vivantes. Nous nous proposons d'étudier l'état biologique de ces cellules.

#### IV. — Etude statistique de la méthode.

L'expérience suivante a été faite dans le but de connaître d'une façon statistique la variation de notre méthode de numération du BCG.

**MATÉRIEL UTILISÉ.** — Une suspension de BCG dans du milieu de Sauton dilué au 1/4, à la concentration de 30 mg par millilitre.

*Diluant* : eau physiologique gélatinée à 5 p. 100.

**MILIEU DE CULTURE.** — Milieu de Dubos à l'albumine bovine (fraction V) et à l'acide oléique. Le BCG fut ensemencé, après dilution dans 30 séries parallèles de flacons de solution gélatinée, dans autant de séries de 4 boîtes de Petri. La technique indiquée plus haut fut suivie dans tous les cas.

Pour tenir compte des effets du diluant sur la viabilité ou sur le nombre des particules, l'expérience fut divisée en trois parties. Les deux premières parties comprenaient 12 séries et la dernière 6. Le travail de dilution et d'ensemencement est complété en quarante-cinq minutes pour chacune des deux premières séries et en vingt minutes pour la dernière.

Après trois semaines d'incubation, nous avons obtenu les résultats suivants :

Une série était complètement contaminée.

Quatre séries avaient, chacune, 2 boîtes contaminées.

Seize séries avaient, chacune, 1 boîte contaminée.

Neuf séries ne présentaient aucune contamination.

Les moyennes de 29 séries sont, ainsi, utilisables (fig. 3).

Le phénomène de mortalité ou d'agglutination des éléments

bacillaires est ici, encore, observé d'une façon sensible. Mais la petite différence obtenue ne rend pas impossible l'étude statistique de cette expérience.

A l'aide de ces chiffres, essayons de déterminer l'intervalle de confiance pour la moyenne  $M$  de la population de laquelle cet échantillon est tiré. Comme il s'agit ici d'un petit échantillon, nous devons nous servir de la distribution de Student. Or, si  $t_{0,05}$  représente la valeur de  $t$  pour  $n-1$  degrés de liberté, de

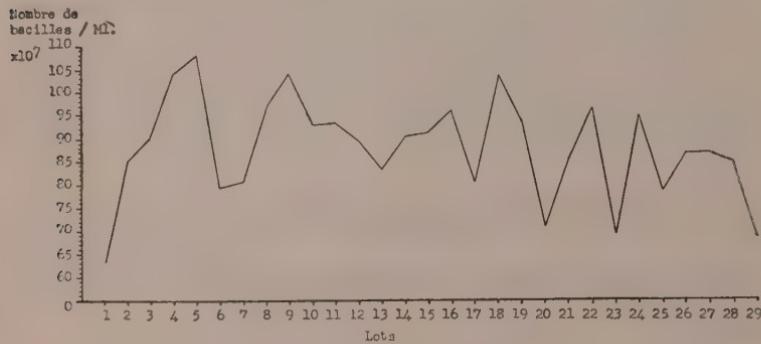


FIG. 3.

Moyenne du premier groupe : 12 premières séries . . . . .	90,66
Moyenne du deuxième groupe : 11 séries suivantes . . . . .	86,84
Moyenne du troisième groupe : 6 dernières séries . . . . .	82,9
Moyenne des trois groupes . . . . .	87,64

## Moyenne de chaque série :

1 . . . . .	63,5 (4)	11 . . . . .	93,3 (3)	21 . . . . .	84,5 (2)
2 . . . . .	85,3 (3)	12 . . . . .	89,75 (4)	22 . . . . .	96 (3)
3 . . . . .	90,7 (3)	13 . . . . .	82,7 (3)	23 . . . . .	68,3 (3)
4 . . . . .	104 (4)	14 . . . . .	90 (4)	24 . . . . .	94,5 (2)
5 . . . . .	108 (3)	15 . . . . .	90,25 (4)	25 . . . . .	77,5 (2)
6 . . . . .	79 (4)	16 . . . . .	95,5 (4)	26 . . . . .	86 (3)
7 . . . . .	80,7 (3)	17 . . . . .	81 (3)	27 . . . . .	86,7 (3)
8 . . . . .	96,7 (3)	18 . . . . .	103,7 (3)	28 . . . . .	84,7 (3)
9 . . . . .	104 (2)	19 . . . . .	93,3 (3)	29 . . . . .	68 (3)
10 . . . . .	93 (4)	20 . . . . .	70 (4)		

sorte que la probabilité soit 0,05 que  $t > t_{0,05}$ , alors la probabilité que

$$\left| \frac{(\bar{x} - M)}{S} \sqrt{n-1} \right| < t_{0,05}$$

est égale à 0,95, soit :

$$P \left\{ \left| \frac{(\bar{x} - M)}{S} \sqrt{n-1} \right| < t_{0,05} \right\} = 0,95 \quad (I)$$

$x$  étant la moyenne de l'échantillon de grandeur  $n$ , dont l'écart quadratique moyen est  $S$ .

Dans le cas présent, nous avons trouvé :

$$\begin{aligned} X &= 87,6 \quad X \times 10^7 \\ S &= 11,4 \quad X \times 10^7 \\ n &= 29 \\ t_{0,05} &= 1,701 \end{aligned}$$

Si nous introduisons ces valeurs dans l'équation I nous obtenons :

$$P \left\{ \frac{|(87,6 \times 10^7 - M) \sqrt{28}|}{11,4 \times 10^7} < 1,701 \right\} = 0,95$$

soit :

$$P \{ 84,0 \times 10^7 < M < 91,2 \times 10^7 \} = 0,95.$$

En d'autres termes, il y a 95 p. 100 de chances que la moyenne de la population soit comprise entre les limites  $84,0 \times 10^7$  et  $91,2 \times 10^7$ .

Un écart de cet ordre de grandeur est très acceptable et indique que la technique utilisée est satisfaisante.

#### RÉSUMÉ.

Dans le but d'apprécier la teneur de suspensions de BCG telles qu'elles sont utilisées comme vaccin, en particules viables, les auteurs ont mis au point une méthode de numération.

En réduisant le nombre des opérations de dilutions, en utilisant un diluant visqueux, en standardisant, autant que possible, les diverses étapes de la technique, en mettant à profit la sensibilité du milieu solide de Dubos, la fidélité de la méthode semble très satisfaisante.

Nous remercions M. le professeur Frappier, directeur de l'Institut de Microbiologie et d'Hygiène de l'Université de Montréal et doyen de l'Ecole d'Hygiène, qui a rendu possible l'exécution de ce travail dans son service des recherches, en nous accordant les moyens matériels nécessaires, ses conseils et ses critiques autorisés.

M. Yvon Grandchamp a bien voulu établir l'interprétation statistique des résultats.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. D. ARONSON et P. SCHNEIDER. The problem of standardization of BCG vaccine. *Am. J. Publ. Health*, 1950, **40**, 533.
- [2] K. BIRKHAUG. Virulence and Tuberculogenic Studies of Sixty-Consecutive Weekly Lots of BCG Vaccine Produced by Standard Technique. *Am. Rev. Tub.*, 1949, **59**, 567-588.

- [3] A. CALMETTE. *La vaccination préventive contre la tuberculose par le BCG.* Masson et C<sup>e</sup>, édit., Paris, 1927.
- [4] A. CALMETTE. Technik der Kulturen des BCG. *Zeitschr. Tub.*, 1928, **50**, 124.
- [5] F. VAN DEINSE et F. SENECHAL. Freeze-dried (lyophilized) BCG. *Tubercle*, 1950, **31**, 157.
- [6] F. VAN DEINSE et F. SENECHAL. Etude comparative du pouvoir allergisant chez le cobaye du vaccin BCG frais et du vaccin BCG glucosé, congelé, desséché. *I<sup>er</sup> Congrès intern. du BCG*, Paris, 1948.
- [7] P. DOMINGO. La preparacion de la vacuna BCG. Habana, 1949.
- [8] P. DOMINGO. Cité par E. F. Krohn [16].
- [9] P. DOMINGO. La standardisation du vaccin BCG. *I<sup>er</sup> Congrès intern. du BCG*, Paris, 1948.
- [10] R. M. DOWDESWELL. Cité par E. F. Krohn [16].
- [11] R. DUBOS. Immunological aspects of BCG vaccination. *Am. Rev. Tub.*, 1949, **60**, 670.
- [12] R. DUBOS et F. FENNER. Production of BCG vaccine in a liquid medium containing Tween 80 and a soluble fraction of heated human serum. *J. exp. Med.*, 1950, **91**, 261.
- [13] F. FENNER, S. P. MARTIN et C. H. PIERCE. The enumeration of viable tubercle bacilli in cultures and infected tissues. *Ann. New-York Acad. Sci.*, 1949, **52**, 751.
- [14] F. FENNER. The viability of BCG vaccine. *Am. Rev. Tub.*, 1951, **64**, 353-380.
- [15] A. FRAPPIER. Some experimental and clinical observations on the stability of BCG vaccine. *Proc. 4<sup>th</sup> intern. Congres Trop. Med. and Malaria*, 1948, 187-201.
- [16] E. F. KROHN. Laboratory control of BCG vaccine. *Acta tubercula scandinaavica*. Suppl. XXX (30), 1952, 1-181. 172 réf. 73 tabl.
- [17] O. SIEVERS. Cité par E. F. Krohn [16].
- [18] D. C. W. THOW. Cité par E. F. Krohn [16].
- [19] K. TOLDERLUND. Cité par E. F. Krohn [16].
- [20] J. S. WOOLLEY et F. G. PETRIK. A potato egg medium for the isolation of tubercle bacilli. *Am. Rev. Tub.* 1947, **55**, 488-494.

# RECHERCHES FAITES AVEC LES MYCOBACTÉRIES MARQUÉES

## I. — **MYCOBACTERIUM PHLEI ET RADIOPHOSPHORE :** **TECHNIQUE D'OBTENTION** **ET VITESSE D'UTILISATION DU PHOSPHORE EXOGÈNE (1)**

par JOSEPH STERNBERG et MARIE-OLGA PODOSKI.

(*Institut de Microbiologie et d'Hygiène  
de l'Université de Montréal.*)

La microbiologie a été assez lente à introduire les isotopes radio-actifs dans son arsenal technique. L'ensemble des travaux publiés dans ce domaine jusqu'en juillet 1951 [28] n'excédait pas 5 à 6 p. 100 des quelques milliers de recherches faites à l'aide des radio-isotopes. Encore faut-il remarquer que presque 80 p. 100 de ces travaux concernent des problèmes de biochimie ou de physiologie microbienne, ou se rapportent à la pharmacologie des agents antimicrobiens (sulfamides, antibiotiques) ou à des recherches *in vitro*, dans lesquelles le microorganisme joue parfois un rôle accidentel, par exemple comme agent de synthèse.

Le nombre des recherches *in vivo* faites à l'aide des microbes marqués se trouve ainsi réduit à 1-2 p. 100 du total des travaux.

Pourtant, c'est la recherche *in vivo* qui constitue l'application la plus riche en possibilités de la technique des corps marqués, laquelle offre un moyen élégant d'aborder certains aspects du substrat biochimique du mécanisme de l'infection ou du processus de défense de l'organisme.

Mais ce retard s'explique aisément lorsqu'on examine les difficultés techniques de l'abord du problème. La radiomicrobiologie est, en quelque sorte, la résultante de l'interpolation de ses deux sciences-mères, la microbiologie et la radiobiologie. Chacune de ces disciplines craint l'influence nocive que l'élément manipulé — microbe ou rayonnement — peut avoir sur la précision expérimentale ou sur le travailleur lui-même. Ensuite, une au moins des qualités essentielles du microbe ou de l'isotope ne peut pas

(1) Ce travail a été exécuté avec l'aide du Ministère de la Santé de la Province de Québec (Subvention fédérale-provinciale à la recherche sur la Santé publique).

être modifiée : il s'agit du développement du microbe et de la nature, de l'énergie et de la période de vie de la radiation de l'isotope ; ce sont ces paramètres qui déterminent les conditions expérimentales.

Quelques exemples concrets sont nécessaires pour une meilleure compréhension de la manière dont on détermine les conditions expérimentales. Soient deux souches de microbes hypothétiquement identiques en ce qui concerne leur composition

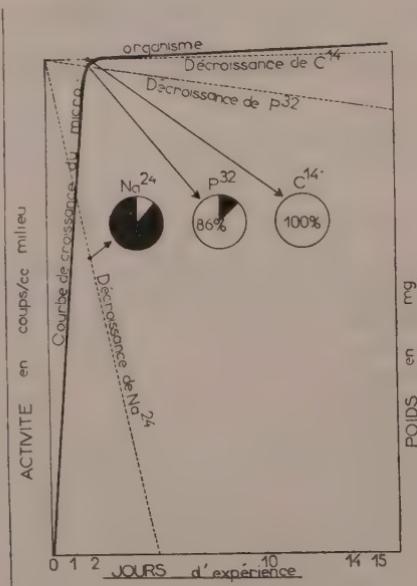


FIG. 1. — Interpolation de la courbe de croissance du microbe avec la courbe de décroissance de l'isotope; cas des microbes à croissance rapide.

chimique ou leurs propriétés biologiques, mais de vitesses de croissance différentes. La première souche (figure 1) donne un poids microbien de 1 mg par millilitre de milieu en 48 heures, tandis que la seconde (figure 2) ne donne le même poids qu'au bout de 14 jours. La même quantité initiale d'isotope est ajoutée à ces cultures, soit 1 microcurie ( $3,7 \times 10^4$  coups/seconde) par millilitre. Mais, pour 3 isotopes de période de vie différente (<sup>14</sup>C, 5 000 ans ; <sup>32</sup>P, 14 jours et <sup>24</sup>Na, 14 heures), le simple fait de l'interpolation des courbes de décroissance du radio-isotope et de croissance du microbe conduira à des résultats entièrement différents, comme le montre le graphique de la figure 1. Ainsi, au bout de 48 heures, 1 mg de microbes contiendra 12 p. 100 de <sup>24</sup>Na (46 200 c./sec.), 86 p. 100 de <sup>32</sup>P (318 200 c./sec.) et

100 p. 100 de  $^{14}\text{C}$  (370 000 c./sec.). La seconde culture (figure 2) sera pratiquement dépourvue de radiosodium (0,02 c./sec.), mais contiendra la même quantité de radiocarbone.

Mais le problème se complique encore lorsqu'il s'agit de faire des expériences *in vivo* avec les microbes marqués, car il faut ajouter encore deux facteurs limitant la liberté expérimentale, savoir : la quantité de microbes injectés à l'animal et le temps nécessaire à la production de l'infection expérimentale. Par

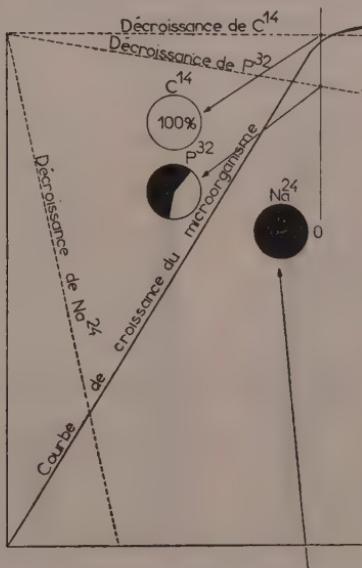


FIG. 2. — Interpolation de la courbe de croissance du microbe avec la courbe de décroissance de l'isotope; cas des microbes à croissance lente.

exemple, dans le cas du BCG, le temps minimum requis pour le cobaye est de 4 semaines et la dose optimum de germes 1 mg (poids humide). La quantité d'isotope intégrée dans les constituants du microbe doit être calculée de telle manière que les deux facteurs de diminution de la radio-activité : 1<sup>o</sup> la dilution de l'élément due à la dissémination des microbes marqués dans l'organisme, et 2<sup>o</sup> la décroissance propre à l'élément radio-actif, donnent à la fin de l'expérience des activités encore mesurables par unité pondérale d'organe. Le graphique 3 montre la différence entre les doses initiales à introduire dans les milieux de culture dans les précédents pris comme exemples. Si le carbone et le phosphore entrent facilement dans les possibilités expérimentales, par contre, les quantités de radio-sodium requises

équivaudraient à  $10^{26}$  tonnes de radium ! Ici donc, les deux paramètres qui déterminent les conditions expérimentales doivent croiser un troisième, celui du maximum de radiation permise pour la vie du microorganisme ainsi que pour la sécurité du travailleur. Heureusement, la résistance des microbes est assez grande, du moins dans le cas de ceux que nous étudions. Pour *Escherichia coli*, Schmidt [24] a établi la dose stérilisante (en 48 heures) autour de 1 000 microcuries par millilitre ; Bonét-Maury signalait qu'il lui avait été possible de dépasser de beaucoup cette dose [3]. Pour l'œuf incubé avec le virus de la grippe,

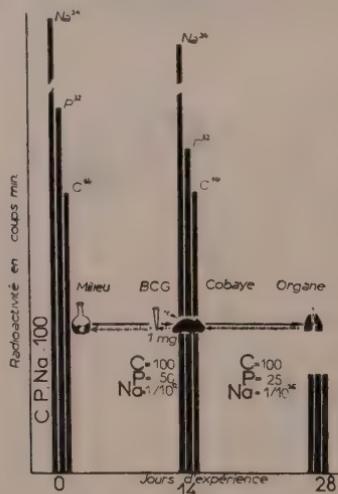


FIG. 3. — Interpolation de la courbe de croissance du microbe et du temps de l'infection expérimentale avec la courbe de décroissance de l'isotope.

Graham indique d'abord des doses très faibles [41] — autour de 0,3 microcuries par œuf — pour rectifier et augmenter la dose, dans une publication ultérieure [42] jusqu'à 1 millicurie par œuf.

Quand l'expérience est faite sur l'animal, les mesures de l'activité sont encore fonction de la nature et de l'énergie du rayonnement de l'isotope et, surtout, de l'adsorption du rayonnement dans les tissus qu'il traverse jusqu'à l'appareil de mesure. Les isotopes à radiation  $\beta$  faible, comme le  $^{14}\text{C}$  ou le  $^{35}\text{S}$  ne sont pas décelables *in vivo* dans ces conditions. Les meilleurs radio-éléments sont, dans ce cas, les émetteurs de rayons  $\gamma$  ( $^{131}\text{I}$  ou  $^{24}\text{Na}$ ) dont la radiation peut être détectée à distance. Les critères donnés par les cliniciens pour la détection *in vivo* des radio-éléments pour les nécessités de la clinique humaine [22, 30] ne s'appliquent que partiellement en radiomicrobiologie.

Outre ces considérations spécifiques de la nouvelle discipline, il faut tenir compte d'autres, rencontrées dans tout travail fait à l'aide des radio-isotopes. Il s'agit d'abord de la réaction d'échange, espèce de « diffusion à l'échelle de l'atome », réaction qui facilite le déplacement de l'atome marqué dans le milieu environnant ou simplement le transfert de sa charge électrique, sans qu'aucune réaction chimique décelable ait lieu. Il semble que les atomes intégrés dans les structures moléculaires plus compliquées (corps organiques) fassent des échanges plus difficilement que ceux intégrés dans des structures simples (corps minéraux) [7]. Ce problème prend une importance capitale en radiomicrobiologie lors de l'identification d'un microbe marqué *in vivo*. Comme le seul critère pris par l'expérimentateur est celui de la détection d'une propriété physique *non spécifique* du microbe, il faut s'assurer par tous les moyens que la radiation captée est émise par un atome intégré dans le corps microbien et non par un atome échangé avec le milieu extérieur. Ici aussi, le contrôle fait en radiobiologie doit être doublé par un autre, spécifique de la radiomicrobiologie. A la différence des recherches faites sur les grands animaux, il est matériellement impossible de savoir, à première vue, si le microbe marqué est mort ou vivant. Il est évident que les échanges du microbe vivant doivent être différents de ceux qui doivent se passer entre les constituants du microbe mort et le milieu environnant. Actuellement, le contrôle de ce processus est réduit à la méthode bactériologique de la réinoculation des microbes et de la numération des cultures qui en résultent [9]. Quant au contrôle des réactions d'échange des microbes vivants, Labaw, Mosley et Wyckoff [17] ont indiqué une technique consistant dans la réinoculation des microbes lavés dans un milieu de subculture identique au premier, mais inactif. Suivant ces auteurs, une activité décelée immédiatement dans le milieu témoigne d'une réaction d'échange passive, tandis que l'apparition tardive d'une activité révèle la mort des microbes et la mise en liberté ultérieure de l'isotope.

Nous avons complété la technique en mesurant les échanges entre les microbes marqués et un milieu dont la structure se rapproche le plus possible de celui du milieu interne de l'animal où se fait l'expérience *in vivo*; en même temps, nous avons contrôlé les échanges des microbes marqués tués, en vue d'avoir un élément de référence pour la mesure des échanges entre les microbes vivants et le milieu. Ces techniques seront exposées en détail dans la partie expérimentale; de plus, tous les points techniques soulevés ont déjà été exposés ailleurs [23, 29, 28].

*En conclusion*, les conditions déterminantes des recherches avec les microbes marqués sont au moins au nombre de trois, savoir :

La courbe de croissance du microbe étudié;

La période de décroissance de l'isotope employé ;  
La nature et l'énergie de rayonnement de cet isotope.

Il faut ajouter encore que le rôle métabolique de l'élément stable correspondant à l'isotope employé doit être assez important dans la vie du microorganisme étudié pour qu'il en justifie le choix.

Pour les recherches préliminaires, le radiophosphore correspond à tous les critères sus-mentionnés. Sa période, son rayonnement  $\beta$  fort et son importance métabolique prépondérante le rendent supérieur aux autres, comme le radiosodium ou le radio-iode, qui ont une émission  $\gamma$  fort désirable pour les recherches *in vivo*, mais, par contre, dont la période trop courte ou l'importance métabolique réduite en rendent l'application difficile.

Nos recherches ont été orientées vers l'étude de la technique d'obtention des mycobactéries marquées au radiophosphore. Avant de passer au BCG et au *Mycobacterium tuberculosis hom.*, nous avons choisi un microorganisme à croissance plus rapide, *Mycobacterium phlei*. Il faut remarquer que des recherches avec des mycobactéries marquées ont été déjà publiées depuis plusieurs années. Ainsi Hevesy et Jensen [14] ont utilisé le radiophosphore pour l'obtention des mycobactéries marquées. Ces travaux ont été repris par Ström [31, 32], qui est le premier en date à avoir fait des essais *in vivo*; il a recherché la dispersion des microbes chez les animaux et même chez l'homme. Les microbes marqués ont été obtenus en ajoutant du  $^{32}\text{P}$  sous forme minérale au milieu de Sauton inoculé. La dose initiale d'isotope n'est pas indiquée, pas plus que l'activité spécifique du milieu. Les microbes sont centrifugés, lavés cinq fois, puis injectés au cobaye. Après des périodes de temps variable, de 4 à 96 heures, l'animal est sacrifié, ses organes sont prélevés et leur activité mesurée par unité de poids. Nous avons essayé de synthétiser les résultats de ces auteurs, en prenant l'activité tissulaire du poumon comme unité et en référant les autres à celle-ci. Le graphique suivant présente l'interprétation des résultats de Ström et Rudback (figure 4).

On voit que les ganglions lymphatiques ont une activité tissulaire relative augmentée, indépendamment du microbe employé, pouvant aller jusqu'à 800 p. 100 de celle du poumon.

Dans une recherche ultérieure, Ström et Widstrom [33] injectent du BCG marqué chez l'homme, par voie sous-cutanée. Ils apprécient ensuite la vitesse de dispersion du microbe, en mesurant l'activité des régions adjacentes au lieu d'inoculation avec un compteur de Geiger appliqué sur la surface de la peau. Ils donnent ainsi comme valeur de dispersion du BCG dans l'organisme humain, la vitesse de 18 cm par 10 minutes sur le trajet des lymphatiques du bras. Quelle que soit l'importance de ces travaux préliminaires, il faut remarquer que les conditions

expérimentales que nous venons d'exposer dans la première partie n'ont pas été entièrement respectées. Ainsi, l'absence d'expériences *in vitro* sur les réactions d'échange possibles ne permet pas d'affirmer avec certitude que la radiation détectée correspond à un atome chimiquement intégré dans le microbe. Des contrôles bactériologiques parallèles, ainsi que la détermination des taux des activités spécifiques des organes analysés auraient pu augmenter la valeur de ces résultats.

Kaplan, Traum et Bankowski [45] ont marqué des mycobactéries avec du radiophosphore introduit sous forme de phosphate minéral dans le milieu de Sauton (approximativement 1 microcurie

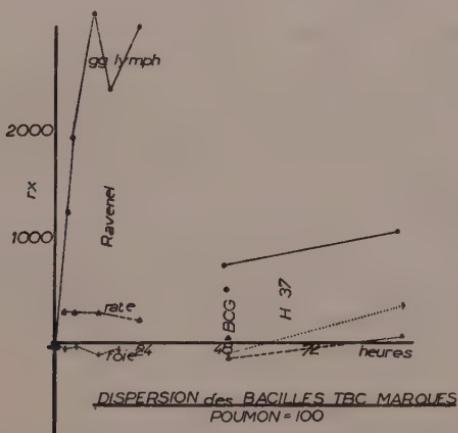


FIG. 4. — Dispersion des mycobactéries marquées au radiophosphore; graphique fait d'après les données de Ström et Rudbeck [32].

par millilitre de milieu). Les bacilles sont centrifugés et lavés jusqu'à la disparition de l'activité des eaux de lavage, puis remis en suspension dans un tampon. L'activité de la suspension est mesurée et comparée à la turbidité, déterminée par néphéломétrie. Les auteurs indiquent une formule qui donne le poids en milligrammes de la culture microbienne, à partir de l'activité mesurée :

$$\text{Poids sec en mg : } \frac{S - F}{B}, \text{ dans laquelle :}$$

S, activité totale par millilitre de suspension.

F, activité par millilitre de filtrat (sur membranes gradocol).

B, activité par milligramme de poids sec de bacilles.

Si les réactions d'échange entre le phosphore minéral du microbe et celui du milieu ne se produisent pas pendant la filtration, la formule peut être employée dans les recherches radio-microbiologiques. Toutefois, les auteurs ne préconisent pas le

remplacement de la numération microbienne par néphéломétrie par la mesure de la radio-activité, qu'ils prennent comme critère de comparaison avec les autres procédés de numération. Citons encore les travaux de Erlenmeyer, Noll et Sorkin [24] qui concernent l'action de quelques produits bactériostatiques sur les mycobactéries. Ils emploient le para-aminothiazol marqué au radio-soufre et ils déterminent la quantité de  $^{35}\text{S}$  incorporée dans les microbes dans différentes conditions expérimentales. Les résultats montrent un parallélisme entre la quantité de soufre incorporée dans le microbe et l'activité bactériostatique du produit.

Ces quelques exemples tirés de la littérature renforcent l'opinion que la certitude d'un travail correct *in vivo* ne peut être obtenue qu'après une étude préalable du comportement *in vitro* du microbe et de l'isotope. Il faut vérifier d'abord si l'isotope est réellement intégré dans les constituants chimiques du microbe ou s'il est simplement adsorbé à la surface du microorganisme. Dans le premier cas, il faut ensuite s'assurer si l'isotope est fortement fixé dans la structure moléculaire d'un constituant chimique ou s'il s'échange avec le milieu environnant, soit pendant la vie, soit après la mort du microbe. Enfin, cette certitude ne peut-être obtenue qu'après l'étude de la répartition du radio-élément dans les différents constituants chimiques du microorganisme.

C'est ce schéma qui nous a servi de guide dans les expériences rapportées dans cette note.

#### PARTIE EXPÉRIMENTALE.

**TECHNIQUES.** — a) *Obtention des mycobactéries marquées.* — Des cultures de *Mycobacterium phlei* ont été obtenues en inoculant 0,3 ml d'une suspension de *M. phlei* âgée de 6 à 8 jours, dans un milieu de Dubos sans glucose. A ce milieu l'on ajoute une solution de phosphate de sodium radio-actif de pH 7,0 et mesurant une activité telle que la dilution dans le milieu (habituellement dix fois le volume de la solution radio-active) donne respectivement une activité de 0,1 microcurie par millilitre, 1 microcurie par millilitre, 10 microcuries par millilitre et 100 microcuries par millilitre (une seule expérience avec la dernière dose) le jour de l'inoculation. Les activités spécifiques des milieux de culture se calculent en rapportant au microgramme de phosphore inactif du milieu, comme suit :

Phosphate monopotassique . . . . .	1,0 g : 226 mg P minéral.
Phosphate disodique . . . . .	6,3 g : 545 mg P minéral.
Hydrolysat de caséine (P-sérolé). . . . .	10 cm <sup>3</sup> : 45 mg P org. (10-20).
	Pour 1 000 ml.

Le phosphore se trouve donc à une concentration de 780 à 790 microgrammes dans 1 ml de milieu de Dubos, desquels seulement 1,2 à 2,5 p. 100 sont constitués par du phosphore organ-

nique, le reste étant du phosphore minéral. Il s'ensuit donc que les activités spécifiques du milieu seront :

Pour 0,1 microcurie/ml . . . 0,1  $\mu$ c/770  $\mu$ g  $^{31}\text{P}$  : 3 000 coups/minute/ $\mu\text{g }^{31}\text{P}$ .  
Pour 1 microcurie/ml . . . 1  $\mu$ c/770  $\mu\text{g }^{31}\text{P}$  : 3 000 coups/minutes/ $\mu\text{g }^{31}\text{P}$ .  
Pour 10 microcuries/ml . . . 10  $\mu$ c/770  $\mu\text{g }^{31}\text{P}$  : 30 000 coups/minutes/ $\mu\text{g }^{31}\text{P}$ .  
Pour 100 microcuries/ml . . . 100  $\mu$ c/770  $\mu\text{g }^{31}\text{P}$  : 300 000 coups/minutes/ $\mu\text{g }^{31}\text{P}$ .

(Rappelons que 1 microcurie =  $3,7 \times 10^4$  c./s.)

Les solutions de phosphore radio-actif sont préalablement stérilisées par irradiation pendant 2 à 3 heures sous une lampe à rayons ultra-violets (lampe germicide fluorescente) placée dans la chambre protectrice du laboratoire « chaud », le *dry box* de la littérature américaine [1, 23]. Ce système est plus sûr que la stérilisation par autoclave ; l'apparition de substances mutagènes après irradiation peut être évitée, d'après Rubin [23], en irradiant quelques heures avant l'inoculation, afin que les oxydes formés se décomposent.

Les cultures sont faites dans des tubes vissés, dans lesquels se passent presque toutes les opérations ultérieures. Les tubes sont mis dans l'étuve pendant des périodes différentes, entre 6 heures et 360 heures. Après la période d'incubation, les tubes sont maintenus pendant quelques heures à la glacière, puis centrifugés à froid à 2 000 tours pendant 30 minutes. Toutes les opérations de lavage se font ensuite à basse température et le plus rapidement possible.

b) *Contrôle de l'adsorption de surface.* — Deux séries de cultures centrifugées sont remises en suspension respectivement dans 10 ml d'eau distillée et 10 ml de solution M/1 000 de phosphate disodique. La suspension est centrifugée de nouveau pendant 30 minutes, puis on répète le lavage cinq à six fois, jusqu'à ce que l'activité des eaux de lavage atteigne un minimum, sans qu'il soit cependant nécessaire qu'elle disparaisse complètement. Des mesures comparatives des activités des eaux de lavage obtenues par ces deux procédés montrent qu'un accroissement de l'activité de la solution de phosphate serait, d'après Labaw, Mosley et Wyckoff, la preuve d'une *adsorption de surface*, c'est-à-dire d'une liaison *physique* de l'isotope sur la membrane microbienne. Le lavage avec une solution phosphatée de faible concentration faciliterait sa mise en liberté.

c) *Contrôle des réactions d'échange.* — Les réactions d'échange suivantes sont contrôlées : 1° après inoculation dans un milieu de culture de constitution identique ou différente du premier et 2° après chauffage des microbes marqués et réinoculation dans un milieu identique ou différent.

Les cultures lavées comme il est indiqué plus haut sont réinoculées dans un milieu de Dubos contenant 10 p. 100 d'une solution de phosphate de sodium, à 1 p. 100, l'équivalent du titre en

phosphore de la solution radio-active. Des échantillons sont prélevés après 1, 2, 4, 6, 12, 24, 48 et 72 heures. Après centrifugation et lavage (trois fois à l'eau distillée), le milieu est filtré sur amiante ou verre fritté et son activité est mesurée. D'après Labaw, Mosley et Wyckoff, la réaction d'échange se traduit par l'apparition immédiate de phosphore radio-actif dans le milieu, tandis qu'une apparition tardive plaide plutôt pour une mise en liberté de l'isotope résultant de la mort du microorganisme et de la désintégration de ses constituants.

La même opération est répétée en inoculant les microbes radioactifs dans un milieu à l'extrait de cervelle et de cœur, dont la formule suivante se rapproche davantage de celle du milieu interne que celle du milieu de Dubos :

Infusion de cervelle de veau . . . . .	200/1 000, 200 g
Infusion de cœur de bœuf. . . . .	250/1 000, 250 g
Protéose. Peptone Difco. . . . .	10 g
Bacto. Dextrose . . . . .	2 g
NaCl . . . . .	5 g
PO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> H. . . . .	2,5 g
Eau distillée . . . . .	Q.S.P. 1 000 g

Enfin le contrôle des réactions d'échange des microbes tués est fait en étudiant parallèlement deux cultures identiques, dont l'une a été préalablement chauffée pendant 1 heure à 60° C.

Des contrôles bactériologiques des caractères morphologiques et tinctoriaux des microbes sont pratiqués pendant les opérations citées.

d) *Etude de la répartition et de l'utilisation du P exogène.* — Le dosage des fractions phosphorées est une adaptation de la méthode de Schmidt et Thannhauser [25] et de ses modifications ultérieures [19, 41]. Les fractions dosées sont : le P minéral et organique acido-soluble, le phosphore lipidique et le phosphore nucléoprotéique.

a) *Dosage du phosphore total (<sup>31</sup>P et <sup>32</sup>P).* — Les cultures lavées sont desséchées à 110° ; on y ajoute 0,25 du mélange sulfo-perchlorique de Lematte-Boinot (1), puis le tube est chauffé prudemment dans un bain de sable jusqu'à la décoloration complète du liquide et avant l'apparition des fumées blanches, qui entraînent du pentoxyde de phosphore, provoquant ainsi des pertes d'isotope. Le liquide clair est amené à 10 ml avec de l'eau distillée, puis neutralisé avec une pincée de CO<sub>3</sub>Na<sub>2</sub> sec ; une partie aliquote est prélevée pour le dosage du phosphore [10] ; dans une autre, le phosphore est précipité sous forme de phosphomolybdate d'ammonium et son activité est mesurée. Ce procédé a l'avantage de ramener toutes les formes de radio-phosphore

(1) 6,5 parties acide perchlorique pur et 3,5 parties acide sulfrique pur.

sous la même forme finale et d'éviter ainsi les erreurs de mesure de l'activité dues à la *self adsorption* du rayonnement.

β) *Dosage du phosphore acido-soluble.* — Le culot microbien est lavé successivement avec 10 ml d'acide trichloracétique à respectivement 10, 5, 3, 3, et 1 p. 100, puis deux fois à l'eau distillée. Tous les lavages doivent être faits à froid (+4°). Entre chaque lavage, le culot est centrifugé pendant 20 minutes, dans une centrifugeuse réfrigérée. Les solutions de lavage sont réunies, filtrées sur amiante ou verre fritté, puis l'on effectue le dosage du phosphore minéral et du phosphore total d'après les techniques susmentionnées. La différence entre le phosphore total acido-soluble et le phosphore minéral donne la valeur du phosphore organique acido-soluble. La mesure de l'activité se réduit ici à celle du phosphore total acido-soluble, la séparation des deux fractions n'est pas nécessaire dans les conditions de la présente expérience.

γ) *Dosage du phosphore lipidique.* — Le résidu microbien est introduit dans un micro-Kumagawa et extrait pendant 12 heures avec 50 ml d'un mélange alcool-éther-chloroforme (1:2:2). Après extraction, le mélange de solvants est filtré sur amiante, puis évaporé sous pression réduite. Le résidu est transvasé quantitativement dans une ampoule à séparation avec 10 ml de chloroforme ; deux lavages à l'eau distillée et avec une solution de NaCl à 5 p. 100 lui enlèvent les phosphates minéraux qui auraient pu être entraînés par l'extraction alcoolique [6] ; les eaux de lavage doivent être inactives [13]. Le chloroforme est évaporé, le résidu est pesé, puis digéré au mélange sulfo-perchlorique et le  $^{31}\text{P}$  ainsi que le  $^{32}\text{P}$  sont dosés. Le P lipidique représente environ 4,25 p. 100 des phospholipides dans les tissus animaux et seulement 1 à 2 p. 100 chez les mycobactéries [18].

δ) *Dosage du phosphore nucléoprotéique.* — Les microbes délipidés sont digérés pendant 24 heures entre 37° et 50° avec 10 ml de NaOH N/1, suivant la technique de Schmidt et Thannhauser. Dans le liquide d'hydrolyse, l'acide désoxyribonucléique peut être reprécipité par de l'acide trichloracétique à 5 p. 100 ; sa valeur retranchée du total permet de déterminer le phosphore de l'acide ribonucléique. Cette technique n'est pas entièrement satisfaisante pour le dosage des acides nucléiques chez les mycobactéries, aussi l'avons-nous complétée par la technique indiquée par Boivin [2] : extraction avec l'acide trichloracétique à chaud (méthode de Schneider [26]) et, finalement, avec l'hydrolyse enzymatique faite à l'aide de la ribonucléase et la désoxyribonucléase, techniques qui seront exposées ailleurs.

ε) *Dosages radio-chimiques.* — Comme il a été déjà indiqué, toutes les fractions phosphorées obtenues sont digérées, puis précipitées sous forme de phospho-molybdate d'ammonium. Le précipité est mis dans des cupules, desséché sous lampe infra-

rouge ou à 80° C, puis son activité mesurée soit dans le simple compteur-cloche, soit avec le compteur à courant de gaz continu (Pre flush flow counter RCL) qui augmente la sensibilité de la mesure, faite directement dans le compteur sans l'écran adsorbant de la fenêtre de mica.

Les chiffres sont rapportés aux taux de  $^{32}\text{P}$  de la même fraction et donnent ainsi l'*activité spécifique* de la fraction, seul critère radio-biologique de la vitesse de synthèse ou d'utilisation du phosphore nouvellement introduit dans un constituant chimique. Les mesures radio-chimiques et leur interprétation ne sauraient être complètes qu'en étant exprimées dans ces termes ; la vitesse de synthèse (temps de « turnover ») s'applique plutôt dans les expériences de physiologie microbienne.

### I. — RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.

1<sup>o</sup> DÉTERMINATION DE LA RÉSISTANCE DES MYCOBACTÉRIES AUX RADIATIONS DU RADIO-PHOSPHORE UTILISÉ. — La mesure de la turbidité des cultures de *Mycobacterium phlei* radio-actives comparée à celle des cultures témoins (spectrophotomètre Beckman, 625 m $\mu$ ) ne donne pas de différences significatives. Ce procédé a été remplacé par la détermination du poids sec des cultures lavées et centrifugées ; la grande difficulté de faire une suspension homogène de *Mycobacterium phlei*, ainsi que la production de pigment en quantité variable enlèvent de la valeur à la première méthode, beaucoup moins longue que celle gravimétrique adoptée.

Les résultats sont exposés dans le tableau I.

TABLEAU I. — **Poids sec de *Mycobacterium phlei* provenant de 90 ml de culture sur milieu de Dubos âgée de 7 jours. (Après cinq lavages à l'eau distillée.)**

$^{32}\text{P}$ en microcuries/ml	POIDS SEC en mg	MOYENNE	VARIATION p. 100
Témoin inactif . . . . .	16,7 15,3	16,0	0
0,1 microcurie . . . . .	17,5 16,6	17,1	6,8
1 microcurie . . . . .	19,4 16,1	17,7	10,6
10 microcuries . . . . .	14,8 16,1	15,5	3,1
100 microcuries (un seul échant.)	14,1	14,1	11,8

TABLEAU II. — Activité des eaux de lavage, valeur absolue en coups/ml.

NOMBRE	ML. lavage	LIQUIDE total	ACTIVITÉ		
			0.1 $\mu$ C./ml	1,0 $\mu$ C./ml	10 $\mu$ C./ml
<i>a) Eau distillée.</i>					
1.	10	10	35 000	340 000	2 850 000
2.	20	20	4 400	6 200	33 000
3.	30	30	600	900	1 700
4.	40	40	300	550	630
5.	50	50	250	350	450
6.	60	60	350	560	550
7.	70	70	330	650	610
8.	80	80	310	610	550
Total . . . . .			38 240	319 820	2 887 490
					24 248 310
<i>b) Phosphate M/l 000.</i>					
1.	10	10	36 800	330 000	3 060 000
2.	20	20	4 300	7 600	38 000
3.	30	30	700	1 400	2 600
4.	40	40	400	760	890
5.	50	50	350	450	450
6.	60	60	560	650	840
7.	70	70	410	560	750
8.	80	80	380	440	440
Total . . . . .			40 900	341 560	3 403 500
					25 728 790

TABLEAU III.

ACTIVITÉ INITIALE	ACTIVITÉ DU MILIEU DE SOUS-CULTURE EN COUPS PAR ML						p. 100			
	1 heure	p. 100	2 heures	p. 100	4 heures	p. 100				
<i>1° Microbes ensemencés dans 25 ml de milieu de Dubos (microbes vivants).</i>										
45 500 . . . . .	558	3,6	604	3,9	604	3,9	620	4,0	666	4,3
230 000 . . . . .	40 420	4,4	10 350	4,5	10 350	4,5	40 350	4,5	44 730	5,1
650 000 . . . . .	28 600	4,4	28 600	4,4	29 250	4,5	29 250	4,5	33 800	5,2
3 535 000 . . . . .	169 700	4,8	169 700	4,8	173 800	4,9	176 700	5,0	187 300	5,3
<i>2° Microbes chauffés à 60° pendant une heure et réensemencés dans 25 ml de milieu de Dubos.</i>										
45 400 . . . . .	6 100	39,5	6 220	40,4	6 270	40,7	6 300	40,9	7 400	46,4
283 000 . . . . .	106 800	40,3	109 200	41,2	110 240	41,6	110 800	41,8	125 300	47,3
610 000 . . . . .	248 800	40,8	249 500	40,9	251 900	44,3	255 000	44,8	283 600	46,5
3 166 000 . . . . .	1 304 400	41,2	313 900	41,5	1 332 900	42,1	1 342 400	42,4	1 497 500	47,3
<i>3° Microbes vivants ensemencés dans 25 ml de milieu. Infusion de cœur et cervelle.</i>										
46 800 . . . . .	622	3,7	635	3,9	672	4,0	670	4,0	725	4,3
283 000 . . . . .	12 170	4,3	12 700	4,3	12 700	4,5	12 800	4,5	13 900	4,9
530 000 . . . . .	23 320	4,4	24 400	4,6	24 400	4,6	23 400	4,8	27 400	5,4
2 865 000 . . . . .	134 600	4,7	140 380	4,9	143 200	5,0	143 500	5,0	151 800	5,3
<i>4° Microbes chauffés une heure à 60° et ensemencés dans 25 ml de milieu. Infusion de cœur et cervelle.</i>										
45 300 . . . . .	6 570	40,4	6 470	40,3	6 570	40,3	6 620	40,5	7 870	48,3
286 000 . . . . .	112 700	39,4	114 100	39,9	114 600	40,4	115 300	40,3	134 400	47,5
534 000 . . . . .	214 900	39,7	213 600	40,0	215 700	40,4	215 700	40,4	244 500	45,6
2 943 000 . . . . .	1 203 700	40,9	1 212 000	41,2	1 212 000	41,2	1 212 000	41,2	1 356 000	46,6

2<sup>o</sup> CONTRÔLE DE L'ADSORPTION DE SURFACE. — Le tableau II montre l'activité exprimée en coups/ml liquide de lavage (eau distillée et phosphates M/1 000). Les valeurs sont ramenées à l'activité du jour de l'inoculation.

3<sup>o</sup> CONTRÔLE DES RÉACTIONS D'ÉCHANGE. — Les résultats exposés dans le tableau III montrent l'activité des milieux de sous-culture homologues et hétérologues, mesurée à des intervalles variés.

#### 4<sup>o</sup> UTILISATION DU PHOSPHORE EXOGÈNE.

TABLEAU IV. — Tableau du taux en  $^{31}\text{P}$  et  $^{32}\text{P}$  de *Mycobacterium-phlei* (25 ml de milieu de Dubos, 0,3 ml inoculum).

HEURE	$^{31}\text{P}$ μg/culture	$^{32}\text{P}$ en coups/culture			$^{32}\text{P}/^{31}\text{P}$ en coups/μg $^{31}\text{P}$		
		0,1 μc	1 μc	10 μc	0,1 μc	1 μc	10 μc
24 . . .	3,6	257	2 830	33 160	71,5	785	9 210
48 . . .	9,5	675	7 220	85 400	71,1	760	8 990
72 . . .	14,2	941	10 290	121 200	66,3	725	8 535
96 . . .	20,2	1 260	13 990	163 920	62,4	693	8 415
144 . . .	23,9	1 420	15 300	186 300	59,4	640,1	7 790
192 . . .	28,1	1 470	15 910	194 500	58,6	634	7 750
240 . . .	26,4	1 492	16 160	202 700	56,5	612	7 680
288 . . .	27,1	1 493	16 070	199 100	55,1	593	7 345
336 . . .	26,4	1 415	15 470	187 700	53,6	586	7 110
384 . . .	27,8	1 448	15 600	193 400	52,1	561	6 955
432 . . .	27,9	1 428	15 510	187 490	51,2	556	6 720

#### II. — DISCUSSION DES RÉSULTATS.

a) INFLUENCE DES RADIATIONS  $\beta$  SUR LA CROISSANCE DE *Mycobacterium phlei*. — Les doses employées (jusqu'à 100 microcuries par millilitre) n'ont pas donné de variation appréciable dans la croissance du *Mycobacterium phlei*. Ceci donne une marge de sécurité légèrement plus grande que celle constatée par Schmidt pour la croissance d'*Escherichia coli* [24]. D'après cet auteur, la dose qui produit une diminution de 50 p. 100 de la culture au bout de 24 heures et une stérilisation complète au bout de 5 à 6 jours serait d'environ 1 000 microcuries par millilitre (fig. 15). La dose à laquelle nous nous sommes fixés — entre 25 et 50 microcuries par millilitre — est faiblement toxique pour les coliformes, et reste sans effet statistiquement appréciable sur *Mycobacterium phlei*. Quant à la possibilité de mutations produites par les radiations aux doses employées dans les conditions de notre expérience [20], l'état de nos recherches ne nous permet pas de tirer des conclusions. Des formes anormalement grandes

et non acido-résistantes ont été parfois observées ainsi qu'un changement macroscopique dans l'aspect des cultures, mais ces phénomènes seraient plutôt un caractère de *Mycobacterium phlei*, car nous avons constaté les mêmes aspects dans les cultures témoins « inactives ».

b) La question se pose de savoir si la radiation introduite dans l'organisme de l'animal injecté pourrait exercer une influence sur lui. La masse microbienne injectée peut atteindre 1 mg (en poids sec), ce qui revient à diffuser de 0.05 à 0.1 microcurie dans un minimum de 250 g d'organisme animal. Comme le minimum

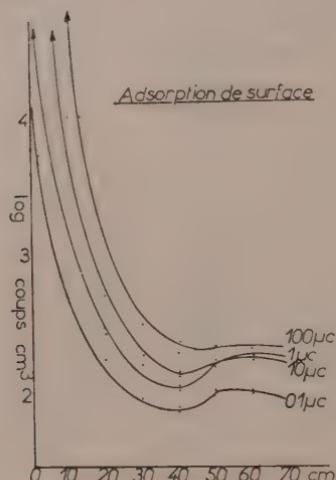


FIG. 5. — Contrôle de l'adsorption de surface. Activité des eaux de lavage, valeur absolue.

de dose nocive est aux environs de 1 millicurie par animal (200 g), il ressort que la quantité introduite est dix mille à vingt mille fois plus faible que la limite permise. Le seul effet de l'isotope est, dans ce cas, le marquage des constituants chimiques des microbes à une concentration suffisante pour en permettre l'étude *in vitro*.

c) ADSORPTION DE SURFACE. — Quelle que soit la quantité initiale de radio-phosphore introduite dans le milieu de culture, les deux premiers lavages réussissent à en enlever 99.5 à 99.7 p. 100, les lavages ultérieurs ne détachent que des quantités insignifiantes d'isotope. Il est inutile de chercher à obtenir la disparition complète de l'activité des eaux de lavage, car ceci peut nuire à la précision expérimentale. La courbe rapidement descendante de l'activité redevient légèrement ascendante (fig. 5 et 6); ce

phénomène, paradoxal en apparence, est dû à la mise en liberté du phosphate minéral et du phosphate acido-soluble, fait qui se produit avec tout tissu trop longuement lavé [25]. La technique

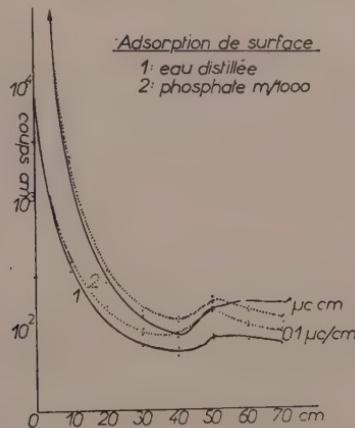


FIG. 6. — Contrôle de l'adsorption de surface. Comparaison entre le lavage à l'eau et à une solution de phosphate de Na. M/1 000.

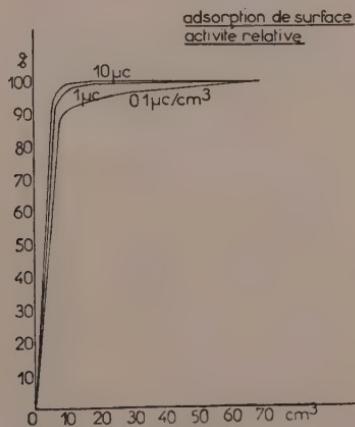


FIG. 7. — Contrôle de l'adsorption de surface. Activité des eaux de lavage, valeur relative (activité totale : 100 p. 100).

préconisée par Graham [41] pour le virus de la grippe marqué au radio-phosphore peut être appliquée ici : lavage rapide et à froid.

Quant à la solution préconisée par Labaw et ses collaborateurs [47] : lavage avec une solution millimolaire de phosphate,

elle réussit à enlever encore plus d'isotope, comme le graphique des activités spécifiques le montre. Ce procédé peut être rapproché de celui de la dilution isotopique, méthode élégante d'analyse des constituants marqués d'un tissu.

*d) Réactions d'échange.* — La courbe plate obtenue par Labaw après réinoculation dans un milieu inactif des cultures d'*Escherichia coli* marquées au  $^{32}\text{P}$  n'a pas été constatée dans le cas de la réinoculation des cultures de *Mycobacterium phlei*. L'inégalité de comportement résulte peut-être dans le taux différent en phosphates labiles des deux microbes. D'après Taylor [34], le taux phosphoré d'*Escherichia coli* (2,72 p. 100 du poids sec d'une culture de 8 heures) se répartit en : 10 p. 100 P désoxynucléoprotéique, 66 p. 100 de P ribonucléique, 12 p. 100 de P lipidique et 3 p. 100 de P non identifié. En prenant comme référence les données de Chargaff, Pangborn et Anderson sur la composition chimique des mycobactéries [4], il est possible d'en faire un tableau comparatif des fractions phosphorées, qui sera discuté plus en détail dans le chapitre suivant (Chargaff, Pangborn et Anderson [4], Goris [16]).

P total : 27,6 microgrammes/mg poids sec mycobactéries = 2,76 p. 100  
ou 46,6 p. 100 du total des éléments minéraux des cendres.

**P p. 100 par mg poids sec.**

	<i>Myc. tub. hom.</i>	<i>Myc. tub. bon.</i>	<i>Myc. tub. av.</i>	<i>Myc. phlei</i>	
P lipidique . . . . .	0,29	0,07	0,10	0,036	Valeurs calculées approxim.
P acido-soluble . . . . :	1,16	1,34	1,25	1,37	
P nucléoprotéique . . . :	4,35	4,35	4,35	4,35	

Il est visible, d'après ce tableau, que le « phosphore labile », minéral et acido-soluble organique constitue une partie assez importante des fractions phosphorées du microbe. Ce fait pourrait expliquer l'aspect ascendant de la courbe de l'activité du milieu de réinoculation. La quantité totale de radio-élément mise en liberté ne dépasse pas 5 p. 100 de l'activité globale du microbe inoculé et se manifeste dans les deux premières heures après la réinoculation. Il est possible que la mise en liberté du radio-phosphore soit due à la dénaturation de la structure colloïdale de la maille nucléoprotéique des microbes morts et à la libération subséquente des sels minéraux enclavés dans cette maille. Une

preuve à l'appui de cette hypothèse serait l'allure franchement ascendante de la courbe de l'activité chez les microbes tués par la chaleur et réinoculés (fig. 8 et 9). La quantité de radio-

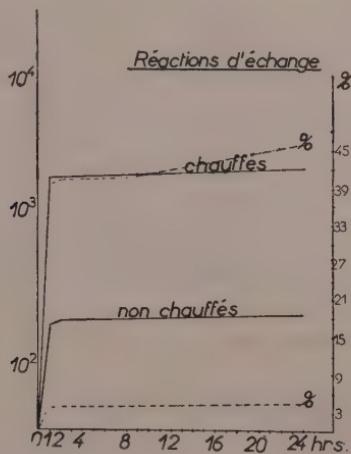


FIG. 8. — Mesure des réactions d'échange. Comparaison entre les réactions d'échange des microbes vivants et tués par chauffage à 60° pendant soixante minutes.

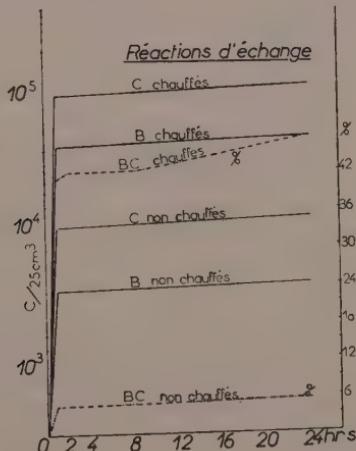


FIG. 9. — Mesure des réactions d'échange. Activité des milieux de sous-culture après inoculation des microbes marqués (B : 286 000 coups, C : 534 000 coups).

phosphore mise ici en liberté n'est jamais égale à la totalité du  $^{32}\text{P}$  incorporé, mais plutôt au taux de phosphore labile qui deviendrait ainsi plus facilement échangeable après la déna-

turation des nucléoprotéines par la chaleur. Le taux de cette réaction d'échange entre dans les possibilités expérimentales *in vivo*, à condition d'en refaire le calcul d'erreur comme suit :

Soit une quantité de 1 mg (poids sec) de microbes marqués au  $^{32}\text{P}$  et mesurant 0,1 microcurie d'activité ( $3,7 \times 10^3/\text{sec.} = 222\,000 \text{ c./min.}$ ). Injectés à un animal de 100 g, et avec un taux de réaction d'échange de 5 p. 100, la quantité de radio-phosphore libérée par réaction d'échange sera  $0,05 \times 222\,000 = 11\,000 \text{ c./min.}$  ; cette quantité répartie uniformément dans l'organisme donne  $11\,000/100 \text{ g} = 110 \text{ c./g organe}$ . C'est cette quantité de 110 c./g qui doit être ajoutée à l'activité initiale de référence, le *mouvement propre du compteur* (background de la littérature anglo-saxonne). Si, par exemple, le mouvement propre est de 30 c./min., toute activité décelée dans un organe et qui dépasse la nouvelle limite de  $30 + 110 \text{ c./min.} = 143 \text{ c./min.}$  peut être rapportée à la présence du radio-phosphore *incorporé* dans le microbe.

Il n'y a pas de raison de penser que les réactions d'échange se passent différemment dans l'organisme et dans le milieu de Dubos, la réinoculation dans un milieu de sous-culture à l'extrait de cervelle + cœur ne donne pas de différences appréciables.

e) RÉPARTITION ET VITESSE D'UTILISATION DU PHOSPHORE EXOGÈNE.  
— Les conclusions précédentes montrent une fois de plus la nécessité d'étudier la composition chimique du microbe et surtout la répartition dans les constituants du microorganisme de l'élément stable, dont on emploie l'isotope radio-actif. La composition chimique des mycobactéries a fait l'objet de nombreuses études [27], mais l'intérêt des chercheurs s'est orienté vers les fractions lipidiques et protéiques plutôt que vers la répartition d'un seul élément dans ces différents constituants. L'utilisation des radio-isotopes impose ce changement de point de vue, car le radio-élément introduit dans le milieu sous forme minérale sera incorporé dans les différents constituants du microbe à un taux variable suivant la vitesse de synthèse du constituant respectif. C'est la notion de *temps de turnover* spécifique à la radio-biologie [35] qui a des applications d'un intérêt fondamental en physiologie microbienne.

En reprenant le tableau des constituants phosphorés du chapitre précédent, il y a lieu de constater que le taux du phosphore lipidique est minimum dans *M. phlei* par rapport aux autres mycobactéries, tandis que le taux des glucides montre une variation inverse : le maximum se trouve dans *M. phlei*, cinq fois plus élevé que dans *M. tuberculosis hominis* à l'aide du radio-phosphore. Le phosphore minéral exogène s'incorpore dans des

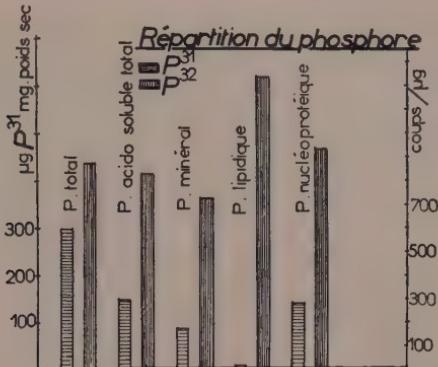
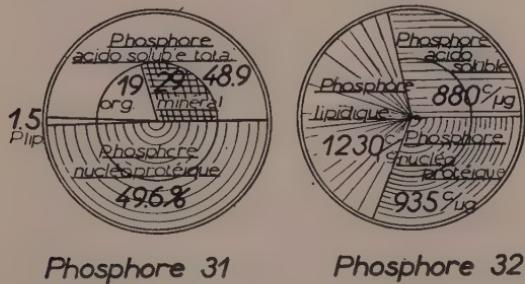


FIG. 10. — Répartition du phosphore dans *M. phlei*. Phosphore 31 et phosphore 32 dans les constituants de *M. phlei*, culture de sept jours sur milieu de Dubos.



#### Répartition du phosphore

FIG. 11. — Répartition du phosphore dans les constituants de *M. phlei*. Distribution relative du phosphore inactif et radioactif : phosphore total : 100 p. 100.

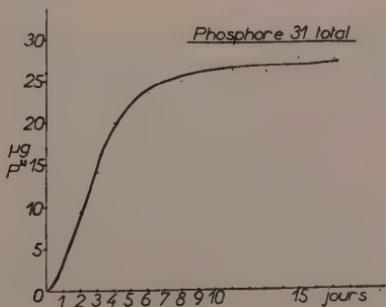


FIG. 12. — Phosphore inactif du *M. phlei* en fonction du temps. Taux phosphoré total des cultures lavées cinq fois (25 ml milieu de Dubos, 0,3 ml. inoculum).

constituants plus stables (phospholipides) tandis que le taux du phosphore glucidique (plus labile) est plus grand dans *M. phlei*. Il est logique de penser que le taux de la réaction d'échange pourrait diminuer dans les expériences avec *M. tuberculosis hominis* ou avec BCG, dont le phosphore s'incorpore dans des constituants à structure plus compliquée. Des expériences en cours avec le BCG nous permettront de contrôler le bien-fondé de cette hypothèse.

Les activités spécifiques des différentes fractions phosphorées

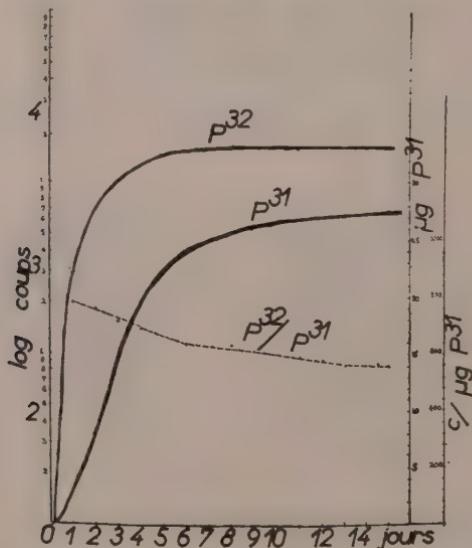


FIG. 13. — Utilisation du phosphore exogène chez *M. phlei*.  
Phosphore 31 et 32 dans une culture mesurant 1 microcurie par ml.

de *Mycobacterium phlei* ont des valeurs assez rapprochées, sauf pour le phosphore lipidique, qui atteint une fois et demie (155 p. 100) l'activité spécifique du phosphore minéral prise comme unité. Ceci semble paradoxal à première vue, car il serait plus logique que les nucléoprotéides soient synthétisés plus rapidement chez un organisme constitué par une masse si considérable de nucléoprotéides. Ce fait peut tenir ou bien à ce que les analyses ont été faites vers la fin de la période de croissance des microbes, ou bien à ce que la richesse des mycobactéries en phospholipides oblige le microorganisme à synthétiser plus rapidement ces constituants.

L'étude des courbes de radio-activité des cultures en fonction du temps (fig. 13, 14, 15) montre d'abord une correspondance

entre celles-ci et la courbe du phosphore total inactif des bactéries. Mais, si ces deux courbes ont la forme exponentielle bien

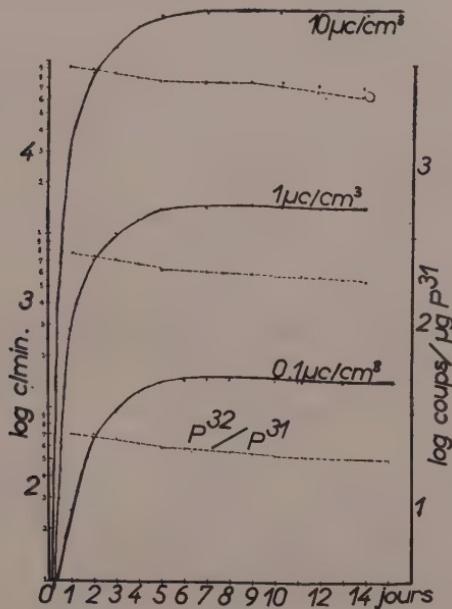


FIG. 14. — Utilisation du phosphore exogène chez *M. phlei*.  
Courbes du radio-phosphore des cultures mesurant 0,1  $\mu\text{c}$ , 1  $\mu\text{c}$  et 10  $\mu\text{c}$  par ml.

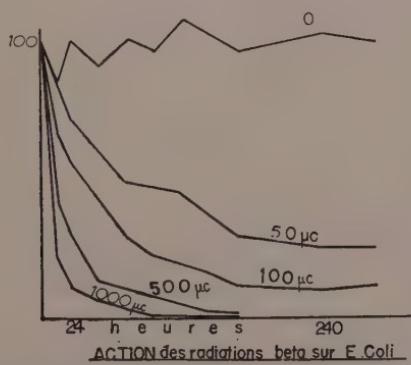


FIG. 15. — Action des radiations bêta sur *Escherichia coli*,  
d'après Schmidt (24).

connue, par contre, la courbe des activités spécifiques se rapproche d'une droite, légèrement descendante. Comme l'activité spéci-

fique est le rapport entre le phosphore total et celui nouvellement introduit, il est logique d'admettre que l'incorporation du phosphore exogène dans les bactéries est uniforme tant que la multiplication microbienne se produit au même rythme. La diminution de l'activité spécifique peut alors constituer un signe d'une augmentation de la masse des microbes morts ou à l'état végétatif ; le phosphore inactif de ceux-ci augmente, une partie du phosphore labile (minéral et organique acido-soluble) quitte les mailles de la structure colloïdale dénaturée des microbes morts et l'activité spécifique globale diminue.

Ce processus a été étudié avec les radio-isotopes dans des conditions analogues chez d'autres microorganismes, avec des résultats conduisant à des conclusions similaires [17]. Il est possible qu'une étude approfondie du turnover du radio-phosphore dans les mycobactéries permette d'apprécier le taux des microbes vivants dans une masse microbienne.

#### CONCLUSIONS.

1° L'emploi des isotopes radio-actifs en microbiologie est fonction de plusieurs variables, dont au moins les suivantes sont déterminantes pour la recherche envisagée :

La courbe de croissance du microbe étudié ;

Les caractères physiques de l'isotope employé (période de vie, nature de la radiation émise, énergie d'émission) ;

L'importance que l'élément stable correspondant à l'isotope employé a dans le métabolisme du microbe étudié.

2° Ces conditions préliminaires une fois remplies, il faut établir si l'isotope est intégré dans les constituants du microbe marqué ou s'il est simplement adsorbé à la surface du microorganisme.

3° Dans le cas d'une intégration chimique, il faut contrôler si l'isotope a une réaction d'échange avec le milieu environnant, lors d'une réinoculation du microbe marqué dans un milieu inactif.

4° Les réactions d'échange doivent être étudiées comparativement chez les microbes vivants et les microbes tués ; la différence de comportement de l'isotope, dans ces cas, est d'une importance capitale pour les recherches faites *in vivo* avec des microbes marqués.

5° Enfin, l'étude de la répartition de l'isotope dans les constituants chimiques contenant l'élément stable correspondant renseigne sur la vitesse de synthèse de ces constituants, ainsi que sur la proportion d'un corps chimique à radio-élément facilement échangeable.

6° Dans *Mycobacterium phlei* marqué au radio-phosphore (introduit sous forme minérale dans le milieu de culture), l'iso-

otope n'est pas adsorbé à la surface du microbe, mais incorporé dans ses différents constituants phosphorés.

7° Une réaction d'échange se passe entre les phosphates marqués et ceux du milieu de sous-culture inactif dans lequel le microbe marqué est réinoculé. Cette réaction ne dépasse pas 5 p. 100 de la totalité du phosphore radio-actif du microbe marqué ; dans l'étude *in vivo*, il faut tenir compte de ce facteur d'erreur dans l'interprétation des résultats.

8° Les microbes tués par la chaleur ont une réaction d'échange plus importante, équivalente au taux du phosphore minéral du microbe, probablement mis en liberté à la suite de la dénaturation de la maille nucléoprotéïdique dans laquelle ce radio-élément était enclavé.

9° La courbe d'intégration du phosphore radio-actif dans les constituants de *Mycobacterium phlei* correspond à la courbe de croissance du microbe. Par contre, la courbe de l'activité spécifique du phosphore total décroît légèrement avec l'âge de la culture. Cette diminution d'activité spécifique pourrait être mise en relation avec la mort des microbes et la mise en liberté du phosphore minéral à la suite de la dénaturation de la structure collodiale du microbe.

10° Parmi les constituants phosphorés de *Mycobacterium phlei*, la fraction phospholipidique montre une activité spécifique plus élevée que celle des autres constituants phosphorés du microbe.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] P. B.AITKEN. *Atomic Energy Project Doc. C 1*, 1950, n° 778.
- [2] A. BOIVIN. *Rev. Canad. Biol.*, 1948, **7**, 368.
- [3] P. BONÉT-MAURY. *Isotope Techniques Conference*, Oxford, 1951 (sous presse).
- [4] E. CHARGAFF, J. PANGBORN et R. J. ANDERSON. *J. Biol. Chem.*, 1931, **90**, 45.
- [5] F. E. CLARIS et C. A. I. GORING. *J. Bact.*, 1951, **62**, 352.
- [6] J. L. DELSAL, *in LOISELEUR. Techniques de Laboratoire*, Masson, Paris, 1947, p. 553.
- [7] *In Echanges isotopiques et Structures moléculaires*, Colloquium International du CNRS, Paris, 1948.
- [8] N. L. EDSON. *Bact. Rev.*, 1951, **15**, 147.
- [9] F. FENNER, S. P. MARTIN et C. H. PIERCE. *Annals N. Y. Acad. Sci.*, 1951, **52**, 625.
- [10] C. H. FISKE et Y. SUBBAROV. *J. Biol. Chem.*, 1925, **66**, 375.
- [11] A. F. GRAHAM. *Can. J. Res. E*, 28, 1950, 186.
- [12] A. F. GRAHAM, G. DEMPSTER et B. BUCHNER. *J. Bact.*, 1952, **63**, 426.
- [13] G. HEVESY. *In Adv. Biol. Med. Physics*, 1948, vol. I ; *Acad. Press N. Y.*, p. 409.
- [14] G. HEVESY et K. A. JENSEN. *Acta Tub. Scand.*, 1949, **21**, 98.

- [15] A. KAPLAN, J. TRAUM et A. BANKOWSKY. *Am. Rev. Tub.*, 1948, **58**, 102.
- [16] In G. KNAYSI. *Acad. Press N. Y.*, 1951, p. 6. Werkman and Wilson, *Bacterial Physiology*.
- [17] L. W. LABAW, V. M. MOSLEY et R. W. G. WYCKOFF. *J. Bact.*, 1950, **59**, 251.
- [18] E. LEDERER, in *Symposium sur la Chimie microbienne*, II<sup>e</sup> Congrès International de Biochimie, Paris 1952, p. 10.
- [19] J. A. McCARTER et E. L. STELJES. *Can. J. Res. E.* **26**, 1948, 333.
- [20] H. D. NEWCOMBE. *J. cellular and comp. Physiol.*, 1952, **39**, 13.
- [21] H. NOLL, E. SORKIN et H. ERLENMEYER. *Helv. chim. Acta*, 1950, **33**, 23.
- [22] E. H. QUIMBY, in P. F. HAHN. *Artificial Radio-isotopes Therapy*. *Ac. Press N. Y.*, 1951, p. 36.
- [23] D. A. RUBIN. *Nucleonics*, 1950, **7**, 5.
- [24] C. F. SCHMIDT. *J. Bact.*, 1948, **55**, 705.
- [25] G. SCHMIDT et S. J. THANNHAUSER. *J. Biol. Chem.*, 1945, **161**, 83.
- [26] W. C. SCHNEIDER. *J. Biol. Chem.*, 1945, **161**, 293.
- [27] F. B. SEIBERT. *Ann. Rev. Microbiol.*, 1950, **4**, 35.
- [28] J. STERNBERG et A. FRAPPIER. *Isotope Techniques Conference*, Oxford, 1951 (sous presse).
- [29] J. STERNBERG et A. FRAPPIER. *Symposium de la Société Royale du Canada*, 1952, C. inéd.
- [30] E. STRAJMAN et N. PACE, in *Adv. in Biol. a. med. Physics*, 1951, vol. II, *Ac. Press N. Y.*, p. 194.
- [31] L. STRÖM et L. RUDBACK. *Acta Tub. Scand.*, 1949, **24**, 98.
- [32] L. STRÖM. *Acta paediatrica*, 1950, **39**, 453.
- [33] L. STRÖM et G. WIDSTROM. *Acta paediatrica*, 1951, **40**, 213.
- [34] A. R. TAYLOR. *J. Biol. Chem.*, 1946, **165**, 271.
- [35] D. B. ZILVERSMIT, C. ENTENMAN et M. C. FISHER. *J. Gen. Physiol.*, 1943, **26**, 333.

(*Travail du Service des Recherches de l'Institut de Microbiologie et d'Hygiène de l'Université de Montréal*  
[directeur : professeur A. FRAPPIER].)

# RECHERCHES SUR LE POUVOIR PATHOGÈNE DES ESPÈCES ANAÉROBIES STRICTES DU GENRE *CORYNEBACTERIUM*

par A.-R. PREVOT et P. TARDIEUX (\*).

(Institut Pasteur. Service des Anaérobies.)

**INTRODUCTION.** — Le pouvoir pathogène des *Corynebacteria* autres que diphtériques, très controversé pour les espèces facultatives, est presque totalement méconnu pour les espèces anaérobies strictes. Or, la délimitation entre les espèces anaérobies strictes et facultatives du genre *Corynebacterium* est parfois très difficile et il règne à ce sujet des divergences d'opinion entre les écoles. Aussi devons-nous commencer par définir très exactement ce que nous entendons par espèces anaérobies strictes du genre *Corynebacterium* : ce sont celles qui, à l'isolement, poussent exclusivement dans la profondeur de la gélose profonde et ne donnent aucune culture à la surface de la gélose inclinée. A l'origine, elles sont toutes catalase-négatives. Cette définition élimine sans discussion l'espèce *Corynebacterium acnes* (Gilchrist) Eberson, qui pousse d'emblée à la surface de la gélose, tout en ayant une préférence pour l'anaérobiose, ce qui fait de lui un anaérobie microaéroophile et catalase-positif, et non un anaérobie strict comme beaucoup d'auteurs le croient.

Les espèces proposées répondant à notre définition [4, 2] sont actuellement au nombre de 11 : *C. diphtheroides* (Jungano) P. 1938 ; *C. avidum* (Eggerth) P. 1938 ; *C. renale cuniculi* (Manteufel et Herzberg) P. 1938 ; *C. lymphophilum* (Torrey) Bergey et al. ; *C. hepato-dystrophicans* (Kuczinski) P. 1938 ; *C. parvum* Mayer 1926 ; *C. anaerobium* (Massini) P. 1938 ; *C. granulosum* (Jungano) P. 1938 ; *C. adamsoni* (Adamson) P. 1938 ; *C. liquefaciens* (Jungano) P. 1938 ; *C. pyogenes bovis* (Roux) P. 1938.

**HISTORIQUE.** — On savait fort peu de choses en 1937 sur le pouvoir pathogène de ces espèces. Dans leur traité des bactéries anaérobies, Weinberg, Nativelle et Prévot [3] mentionnent toutefois que *C. anaerobium* a été isolé par Massini en 1913 [4] dans

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 8 janvier 1953.

un cas d'otite compliquée de mastoïdite, terminée par une septicémie et, dans un autre cas, d'arthrite purulente ; que *C. parvum* a été isolé par Mayer en 1926 [5] de septicémies mortelles, de cystites purulentes et d'infections annexielles ; que *C. lymphophilum* a été isolé par Torrey en 1916 [6] d'adénopathies. Les autres espèces passaient à cette époque pour des saprophytes banaux : *C. hepatodystrophicans* a été isolé par Kuczinski [7] d'organes de singes atteints de fièvre jaune : *C. renale cuniculi* par Mantefel et Herzberg [8] en 1930 du rein du lapin normal ; *C. avidum*, par Eggerth [9] de l'intestin humain normal ; *C. adamsoni* par Adamson [10] en 1919 de plaies de guerre ; *C. diphteroides* et *C. granulosum* par Jungano [11] en 1909 de l'intestin du rat blanc.

En 1939, Grumbach et Hotz ont observé une septicopyohémie mortelle consécutive à l'extraction d'une dent cariée. A l'autopsie : thrombose purulente de la jugulaire et du sinus sigmoïde, où on isole *C. diphteroides* à l'état pur. Les métastases multiples : pulmonaires, pleurétiques, hépatiques et spléniques contenaient le même germe à l'état pur [23]. Enfin, en 1953, Seeliger [24] a isolé *C. liquefaciens* en culture pure d'un abcès sous-maxillaire et a souligné le pouvoir pathogène des Corynèbactéries anaérobies.

Ayant évoqué dès le début de ce travail la grande difficulté de distinguer les espèces anaérobies facultatives et strictes du genre *Corynebacterium*, nous croyons devoir mentionner ici, pour mémoire, que de très nombreux travaux américains ont été publiés sur le pouvoir pathogène des Corynèbactéries facultatives autres que la diphtérique. Ne pouvant les analyser tous en particulier, nous nous bornerons à citer le plus récent : Fleisher [43] a personnellement isolé 27 souches par hémoculture et pense que la présence de ces germes dans le torrent sanguin est le reflet d'une infection du système lympho-réticulo-endothelial et, vu le taux important d'hémocultures positives dans les lymphogranulomatoses malignes et dans les lymphomatoses bénignes ou malignes, recommande de rechercher ces maladies chaque fois que l'hémoculture déclèle une Corynèbactérie. On se rappelle d'ailleurs les travaux de Bunting et Yates [14] qui avaient attribué l'étiologie de la maladie de Hodgkin à *C. hodgkini* et ceux de Prévot et Courdurier [45], qui ont isolé *C. avidum* dans un cas mortel de lymphogranulomatose maligne où il avait déterminé une septicémie grave.

La réalité du pouvoir pathogène des Corynèbactéries facultatives autres que diphtériques a été démontrée par Lovell et Cotchin en 1952 [46] qui ont provoqué des lésions rénales chez la souris par injections intraveineuses de suspensions de *C. pyogenes*, de *C. boris* et de *C. renale*. Ce qui distingue ces lésions c'est leur répartition exclusive dans la medulla pour les deux premiers et

leur extension au cortex pour *C. renale*, ce qui incite ces auteurs à penser que ce dernier provoque une maladie expérimentale vraiment spécifique. Plus récemment Diaz et Arjona [21] ont isolé par médulloculture dans des cas d'endocardite subaiguë une espèce nouvelle : *C. endocarditis*, que Broustet, Brisou et Berge [22] ont retrouvée deux fois en France par hémoculture. Ils considèrent cette espèce comme pathogène et non comme un saprophyte banal.

TRAVAUX PERSONNELS. — Depuis 1948, nous avons isolé 39 souches de *Corynebacterium* anaérobies strictes ou micro-aérophiles dont voici le tableau de répartition par souche, espèce, maladie ou habitat :

*C. diphtheroides*. — 6 souches : ostéite fibreuse (379) ; arthrite purulente (434) ; septicémie (454 A) ; rectocolite hémorragique (463 A) ; pseudoactinomycose (536) ; pyorrhée alvéolaire (618 B).

*C. avidum*. — 8 souches : septicémie au cours d'une lymphogranulomatose maligne (365) ; septicémie récurrente avec splénomégalie (562) ; pseudoactinomycose (523) ; endocardite maligne (735, 759 et 760) ; conserve de sardines infectée (752) ; boue d'étang (592 C).

*C. parvum*. — 6 souches : septicémie (395 et 722 C) ; érythème noueux (476) ; méningite purulente (516 A) ; abcès du scrotum (595) ; abcès cérébral (643 C).

*C. granulosum*. — 4 souches : arthrite purulente (714) ; pseudoactinomycose (402 A) ; endocardite maligne (583) ; acné (744).

*C. anaerobium*. — 7 souches : pyorrhée alvéolaire (757) ; endocardite maligne (671, 678 et 758) ; adénite suppurée (637 C) ; pyothorax (699 A) ; mammite aphthuse (808 B).

*C. pyogenes*. — 2 souches : adénite suppurée (637 A, 637 B).

*C. liquefaciens*. — 6 souches : arthrite purulente (812 D) ; septicémie (783) ; pyorrhée alvéolaire (617) ; adénite purulente (814) ; abcès de la gorge (746) ; boue d'étang (PD 2).

Plusieurs de ces souches ont déjà fait l'objet de travaux, soit de bactériologie [17], soit de pathogénie [18, 19].

De ce tableau nous pouvons tirer la systématisation des espèces par maladies, en commençant par les maladies ayant fourni le plus grand nombre de souches.

#### I. — ENDOCARDITE MALIGNE : 7 cas.

*Cas 583* (Dr Gaillard, hôpital Boucicaut). — Il s'agissait d'un homme atteint d'endocardite d'Osler avec thrombophlébite. Dans le thrombus septique, on isole *C. granulosum*. Ce germe se présente donc, dans ce cas, comme un pyogène ayant infecté secondairement un vaisseau au cours d'une endocardite dont la preuve n'a pas pu être faite (aucun streptocoque n'a été isolé).

*Cas 671* (Dr Donzelot, hôpital Broussais). — Au cours de cette

endocardite, l'hémoculture pratiquée cinq fois fut négative trois fois et positive deux fois. Dans chacune des hémocultures positives on isole *C. anaerobium*. Dans les subcultures sont apparus des mutants anaérobies facultatifs, mais le test de la catalase reste négatif. Ce germe est résistant à la pénicilline et à l'auréomycine. Il est très sensible à la streptomycine, sensible à la chloramycétine et peu sensible à la terramycine. Dans ce cas, il se présente comme le seul germe isolé et peut donc être considéré comme l'agent étiologique de la maladie.

*Cas 678* (Dr Worms). — Isolé à l'état pur par hémoculture d'une endocardite, *C. anaerobium* était anaérobie strict à l'origine ; il a donné par la suite des mutants anaérobies facultatifs, tout en restant catalase-négatif. Ici encore, il apparaît comme l'agent étiologique de cette endocardite.

*Cas 758* (Dr Fabiani). — Dans cette endocardite chez un Arabe algérien, on isole en culture pure *C. anaerobium*, anaérobie strict au début, donnant ensuite un mutant microaérophile restant catalase-négatif. Ici encore, le germe apparaît comme le seul microbe isolé par hémoculture.

*Cas 735* (Dr Fabiani). — Endocardite à évolution lente chez un Arabe algérien. A deux reprises, par hémoculture, on isole *C. avidum*, à l'exclusion de tout autre germe. Cette souche a une tendance à la microaérophilie, elle devient catalase-positive après repiquages en tube de Hall. Une fois de plus, ce germe apparaît comme l'agent unique de la maladie.

*Cas 759* (Dr Fabiani). — La souche de *C. avidum* isolée dans ce cas par hémoculture chez un Arabe atteint d'endocardite est restée anaérobie stricte et catalase-négative. Elle apparaît comme l'agent unique de la maladie.

*Cas 760* (Dr Fabiani). — La souche de *C. avidum* est encore isolée ici à l'état pur chez un Arabe atteint d'endocardite. Elle est anaérobie stricte durable et catalase-négative.

**CONCLUSION.** — Une série de 7 cas d'endocardites malignes où le streptocoque n'a pas été isolé reconnaissent un seul germe anaérobie comme agent étiologique, isolé en culture pure du sang une ou plusieurs fois au cours d'une maladie. Ce germe peut être *C. avidum* (trois fois), *C. anaerobium* (trois fois) ou *C. granulosum* (une fois). Cette constatation mérite d'être rapprochée des cas d'endocardite subaiguë de Diaz et Arjona [21] causés par *C. endocarditis* et de ceux de Broustet, Brisou et Berge [22] causés par la même espèce.

## II. — SEPTICÉMIES : 6 cas.

Ces 6 cas peuvent se grouper en 2 cas de septicémie puerpérale, 2 de septicémies diverses et 2 cas de septicémie récurrente dans les maladies du système lympho-réticulo-endothélial.

*Cas 355* (Dr Junot, hôpital Pasteur). — Cette souche est l'une des plus intéressantes qu'il nous ait été donné d'étudier [15]. Elle a été obtenue à l'état pur par hémoculture dans un cas de septicémie récurrente superposée à une lymphogranulomatose maligne (dont le diagnostic n'a pu être fait qu'à l'autopsie, les signes capitaux hodgkiniens n'étant pas apparus). Cette souche répond à l'espèce *C. avidum*; elle était anaérobie stricte et durable et catalase-négative.

*Cas 562* (Dr Siguier, hôpital de la Pitié). — Dans un cas de septicémie récurrente chez un Nord-Africain atteint de lymphomégalie médiastinale, l'hémoculture a permis d'isoler cette variété de *C. avidum* [19]. Un traitement d'épreuve par radiothérapie a amené la chute de la température et la régression de la splénomégalie. Il s'agissait d'une souche anaérobie stricte catalase-négative qui, secondairement, a donné un mutant microaérophile catalase-positif. Résistante à la pénicilline et à l'auréomycine, elle était sensible à la chloromycétine. Le rôle possible de cette souche dans la constitution de la lympho-réticulo-endothéllose où elle a été trouvée, a été discuté dans une note antérieure [19] où on admettait la possibilité de la transformation des grandes cellules inflammatoires de Langhans en cellules néoplasiques.

*Cas 395* (Dr Mollaret, hôpital Claude-Bernard). — Cette souche, isolée d'un cas de septicémie post-puerpérale mortelle, répondait à l'espèce *C. parvum*, anaérobie stricte durable, catalase-négative.

Ce fait rejoint les observations princeps de Mayer [5] qui a isolé les premières souches de ce germe dans des cas semblables.

*Cas 722 C* (Dr Vincent, Hôpital Civil du Havre). — Cette souche de *C. parvum* a été obtenue par hémoculture dans un cas de septicémie post-abortive. Elle était microaérophile d'emblée, mais catalase-négative. Cette nouvelle observation de septicémie puerpérale s'ajoute aux cas de Mayer et à l'observation précédente.

*Cas 454 A* (Dr Chevé, Périgueux). — Cette souche de *C. diphtheroides* a été isolée par hémoculture dans une septicémie témoin d'une infection généralisée en même temps que *W. perfringens*. Étant donné le haut pouvoir pathogène propre de ce dernier, il n'est pas possible d'attribuer certainement un rôle au premier dans la constitution du syndrome, autre que celui de germe associé. Cette souche était anaérobie stricte durable et catalase-négative.

*Cas 773* (Dr Sansonnens, Berne). — Cette souche de *C. liquefaciens* a été isolée par hémoculture dans une septicémie consécutive à une infection hépatique. Elle était anaérobie stricte durable et catalase-négative. Isolée à l'état pur, il est vraisem-

blable qu'elle a joué un rôle étiologique majeur dans cette infection septicémique.

CONCLUSION. — Les corynèbactéries anaérobies peuvent infecter les organes lymphoïdes et les viscères et passer secondairement dans le sang, déterminant des septicémies graves dont certaines sont mortelles.

### III. — ADÉNITES SUPPURÉES, 4 CAS.

*Cas 637 A* (Dr Grumbach, Zurich). — Cette souche a été isolée dans un cas d'adénite suppurée. Elle répond à l'espèce *C. pyogenes* et était anaérobie stricte durable et catalase-négative.

*Cas 637 B* (Dr Grumbach, Zurich). — Cette souche a été isolée dans un cas d'adénite purulente. Elle répond à l'espèce *C. pyogenes*, anaérobie stricte durable, catalase-négative.

*Cas 637 C* (Dr Grumbach, Zurich). — Cette souche de *C. anaerobium* a été isolée d'une suppuration ganglionnaire. Elle était anaérobie stricte durable et catalase-négative.

*Cas 814* (Dr Verrier, hôpital Lyautey, Strasbourg). — Cette souche, appartenant à l'espèce *C. liquefaciens*, a été isolée en culture pure d'une adénite suppurée. Elle était microaérophile d'embrlée et est devenue catalase-positive au premier repiquage en tube de Hall. L'observation de la maladie est d'un grand intérêt pour la discussion du pouvoir pathogène des corynèbactéries anaérobies. Nous la citons en entier : Sous-officier infirmier robuste sans antécédents pathologiques. En mai 1952, asthénie et perte de poids. En juin, apparition d'un ganglion sous-angulo-maxillaire gauche du volume d'une noix un peu dououreux. La radioscopie révèle une opacité hilaire polycyclique. Apyrexie. Cuti- et intradermo-réaction à la tuberculine négatives. Pas de modification importante du sang. Ce ganglion est prélevé stérilement pour examen. Il est rempli de pus altéré, sans éosinophile, ni cellules malignes, ni B. tuberculeux. La culture en aérobiose reste stérile et devient positive en anaérobiose : il s'agit d'un *Corynebacterium* anaérobie en culture pure. L'examen histo-pathologique du ganglion montre un aspect d'adénite suppurée subaiguë banale. Un cobaye inoculé avec ce pus meurt en quarante-six jours en présentant une infection généralisée à *C. liquefaciens*. Après ganglioectomie, le malade va mieux et sa cuti-réaction redévient positive en même temps que ses ombres hilaires s'atténuent.

Cette observation présente l'intérêt suivant : l'extirpation chirurgicale du ganglion permet d'affirmer qu'il ne s'agit pas d'un germe de la peau introduit par une fausse manœuvre dans les cultures. Elle nous donne donc une preuve indiscutable de l'existence des adénites purulentes à *Corynebacterium* anaérobies reproductibles sur l'animal d'expérience.

## IV. — PSEUDOACTINOMYCOSES, 3 cas.

Ces 3 cas ont déjà été étudiés dans un mémoire d'ensemble sur les cellulites jugales [18].

*Cas 523* (professeur Goret, Lyon). — Cette souche a été isolée en culture pure du pus d'une pseudoactinomycose canine. Elle appartient à l'espèce *C. avidum*. Elle était anaérobie stricte, mais a subi la mutation facultative et catalase-positive.

*Cas 536* (Dr Segretain). — Cette souche a été isolée dans un cas de pseudoactinomycose chez un homme de 40 ans malade depuis quatre ans. Elle appartient à l'espèce *C. diphtheroides*, était anaérobie stricte durable et catalase-négative.

*Cas 402 A* (Dr Béal, Tenon). — Cette souche a été isolée dans une suppuration pseudoactinomycosique chronique du maxillaire inférieur après fracture. Elle appartient à l'espèce *C. granulosum*, anaérobie stricte durable et catalase-négative.

**CONCLUSION.** — Les suppurations à grains blancs d'aspect actinomycosique ne sont pas toujours provoquées par des actinomycètes. Les espèces anaérobies du genre *Corynebacterium* peuvent réaliser ce syndrome.

## V. — ARTHRITES SUPPURÉES, 3 cas.

*Cas 434* (Dr Grumbach, Zurich). — Cette souche appartient à l'espèce *C. diphtheroides*. Elle a été isolée dans un cas d'arthrite suppurée du genou. Elle était anaérobie stricte et durable et catalase-négative.

*Cas 714* (Dr Brygoo, Saigon). — Cette souche appartient à l'espèce *C. granulosum*. Elle a été isolée d'une arthrite traumatique suppurée du genou. Elle est anaérobie stricte durable et catalase-négative.

*Cas 812 D.* — Cette souche appartient à l'espèce *C. liquefaciens*. Elle a été isolée d'une arthrite purulente fémoro-tibiale post-aphteuse chez un veau. Elle est anaérobie stricte durable et catalase-négative.

**CONCLUSION.** — Le tissu articulaire est capable de s'infecter par les espèces anaérobies du genre *Corynebacterium* qui provoquent ainsi de véritables arthrites purulentes.

## VI. — ABCÈS ET SUPPURATIONS DIVERSES, 10 cas.

*Cas 595* (Dr Terial). — Cette souche appartient à l'espèce *C. parvum*. Elle a été isolée dans un cas d'abcès du scrotum. Elle était anaérobie stricte durable et catalase-négative.

*Cas 643 C* (hôpital de La Pitié). — Cette souche appartient à l'espèce *C. parvum*. Elle a été isolée dans un cas d'abcès céré-

bral pariétal en association avec *F. fusiformis*. Elle était anaérobie stricte durable et catalase-négative.

*Cas 746* (Dr Seeliger, Bonn). — *C. liquefaciens*, isolée d'un abcès de la gorge. Anaérobiose microaérophile d'emblée, catalase devenue positive au troisième repiquage en tube de Hall.

*Cas 618 B* (Dr Vinzent, Hospice Civil du Havre). — *C. diphtheroides*, isolée d'une pyorrhée alvéolaire par gingivo-culture, anaérobiose stricte durable, catalase négative.

*Cas 657* (Dr Vinzent, Hospice Civil du Havre). — *C. anaerobium* isolée par gingivo-culture d'une pyorrhée alvéolaire, anaérobiose stricte durable, catalase-négative.

*Cas 617* (Dr Vinzent, Hospice Civil du Havre). — *C. liquefaciens* isolée par gingivo-culture d'une pyorrhée alvéolaire. Anaérobiose stricte durable. Catalase-négative.

*Cas 379* (Dr Beerens, Institut Pasteur de Lille). — *C. diphtheroides* isolée d'une ostéite fibreuse suppurée, anaérobiose stricte durable, catalase-négative.

*Cas 514 A* (Dr Robin, Rouen). — *C. parvum* isolée d'une méningite purulente par culture du liquide céphalo-rachidien (associé à un fusiforme). Anaérobiose stricte durable. Catalase-négative.

*Cas 699 A* (Dr Brygoo, Saigon). — *C. anaerobium* isolé d'un pyothorax. Anaérobiose stricte durable. Catalase-négative.

*Cas 808 B.* — *C. anaerobium* isolé d'une mammite suppurée post-aphteuse ; associé à *Staphylococcus indolicus*. Microaérophile d'emblée. Catalase-négative.

**CONCLUSION.** — Les *Corynebacterium* anaérobies peuvent infecter de nombreux organes et viscères et y provoquer des suppurations et des abcès.

## VII. — AUTRES INFECTIONS.

*Cas 463* (Dr Piéchaud, Institut Pasteur). — *C. diphtheroides* isolé d'une recto-colite hémorragique, associé à *Catenabacterium contortum*. Anaérobiose stricte. Catalase-négative.

*Cas 744* (Dr Said Bilal Golem, Ankara). — *C. granulosum* isolé d'une pustule d'acné. Anaérobiose stricte durable. Catalase-négative.

**CONCLUSION.** — L'acné peut être causé par un *Corynebacterium* autre que *C. acnes*.

## DISCUSSION.

L'isolement fréquent en culture pure, plus rarement en association, dans des infections graves, parfois mortelles, nous permet d'affirmer que les espèces anaérobies strictes ou micro-aérophiles du genre *Corynebacterium* sont douées de pouvoir pathogène. Ces infections peuvent se grouper en : 1<sup>o</sup> endocardites

malignes, où le streptocoque n'a pas été isolé ; 2° septicémies, dont plusieurs au cours de maladies du système lympho-réticulo-endothélial ; 3° adénites purulentes ; 4° suppurations diverses (pseudoactinomycose, abcès viscéraux, méningite, pyorrhée alvéolaire, pyothorax, mammites, ostéite) et en d'autres maladies moins fréquemment observées (recto-colites hémorragiques, acné).

Deux arguments pourraient être opposés à cette thèse :

1° Dans la majorité des cas, la preuve expérimentale du pouvoir pathogène des souches isolées n'a pas pu être faite. Mais cette donnée entre dans un ordre de faits qui a été longuement étudié ailleurs et résumé dans un récent travail [20] dont nous reproduisons ici l'une des conclusions : en dehors d'un tout petit nombre d'espèces, nous ne savons pas par quel mécanisme se produisent les infections anaérobies endogènes, ni pourquoi l'infection expérimentale réussit ou échoue. Cela tient, ou bien à ce que nous ne connaissons pas l'animal réceptif ou le tissu sensible, ou bien à ce que les souches perdent leur pouvoir pathogène en culture. L'observation 814, intéressante à plusieurs chefs, tendrait à faire pencher pour la deuxième hypothèse. En effet, le cobaye inoculé avec le pus total du malade, avant passage par les milieux de culture, a reproduit une infection purulente généralisée et on a résolé chez lui le *Corynebacterium liquefaciens* à l'état pur. Au contraire, une culture pure de la même souche a été incapable de reproduire la moindre lésion chez l'animal.

2° Le deuxième argument qui pourrait être opposé découle des faits constatés par Douglas et Gunter [12] en les transposant aux anaérobies stricts. Ces auteurs ont en effet constaté la fréquence des espèces aérobies et microaérophiles de *Corynebacterium* sur la peau humaine et attribuent leur présence dans le plasma récolté pour transfusion — donc leur croissance dans les milieux de culture de contrôle — à un défaut de stérilisation de la peau. Cet argument est probablement valable pour les aérobies et microaérophiles, dont on connaît la fréquence et l'abondance sur la peau. Mais on sait aussi que les anaérobies stricts sont beaucoup plus rares sur la peau et, en étudiant nos propres observations, nous concluons que dans beaucoup des cas analysés on ne peut pas mettre en doute la bonne stérilisation de la peau. C'est encore de l'observation 814 que nous tirons la meilleure preuve de la relation de cause à effet entre *C. liquefaciens* et l'adénite suppurée où il a été isolé, puisque c'est par extirpation chirurgicale et ensemencement de pus ganglionnaire que nous avons réussi à le cultiver.

L'examen d'ensemble de notre statistique nous permet 3 autres conclusions :

1<sup>o</sup> L'existence d'une forme d'endocardite maligne à *Corynebacterium* anaérobiose (7 cas).

2<sup>o</sup> L'affinité des Corynébactéries anaérobies pour le système lymphatique (6 cas).

3<sup>o</sup> La propension pour ces germes à passer dans le torrent circulatoire où ils créent une véritable septicémie parfois continue, parfois récurrente (13 cas).

#### CONCLUSIONS.

I. Trente-neuf souches de *Corynebacterium* anaérobies strictes ou microaérophiles ont été étudiées, dont 36 venant d'infections (33 humaines, 3 animales).

II. Ces infections se répartissent en septicémies (7 cas) ; endocardites malignes (6 cas) ; adénites suppurées (4 cas) ; pseudo-actinomycoses (3 cas) ; arthrites suppurées (2 cas) ; suppurations diverses (10 cas), érythème noueux (1 cas) et acné (1 cas).

III. Le pouvoir pathogène expérimental des souches en culture pure est difficile à mettre en évidence, mais il a été prouvé pour certaines par l'inoculation directe du pus et la reproduction de l'infection expérimentale, puis par la reprise du germe chez l'animal.

IV. Les *Corynebacterium* anaérobies stricts présentent une affinité très nette pour le système lymphoïde (6 cas) et pour les séreuses (5 cas).

V. Le terme de « corynébactériose » proposé antérieurement pour les infections causées par les Corynébactéries est justifié par cette étude.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. R. PRÉVOT. Ces Annales, 1946, **72**, 2.
- [2] A. R. PRÉVOT. *Manuel de Classification des Anaérobies*, 2<sup>e</sup> Edit., Masson 1948, p. 256 à 261.
- [3] WEINBERG, NATIVELLE et PRÉVOT. *Les Microbes Anaérobies*. Masson 1937, p. 576 à 586.
- [4] MASSINI. *Zeitschr. g. Exp. Med.*, 1913, **2**, 81.
- [5] MAYER. *Zentralbl. Bakt.* I. 1926, **98**, 370.
- [6] TORREY. *J. Med. Res.* 1916, **34**, 65.
- [7] KUCZINSKI. *Klin. Wochenschr.* 1929, 58.
- [8] MANTEUFEL et HERZBERG. *Zentralbl. Bakt.* I, 1930, **116**, 266.
- [9] EGGERTH. *J. Bact.* 1935, **30**, 289.
- [10] ADAMSON. *J. Path. a. Bact.* 1919, **22**, 345.
- [11] JUNGANO. *C. R. Soc. Biol.* 1909, **66**, 112 et 122.
- [12] H. C. DOUGLAS et E. GUNTER. *J. Bact.*, 1946, **52**, 15.
- [13] M. S. FLEISHER. *Am. J. Med. Sci.* 1952, **224**, 548.
- [14] BUNTING et YATES. *Arch. Internat. Med.*, 1913, **12**, 236.
- [15] A. R. PRÉVOT et J. COURDURIER. Ces Annales. 1949, **76**, 232.
- [16] R. LOVELL et E. J. COTCHIN. *J. Comp. Path.*, 1952, **62**, 245.

- [17] A. R. PRÉVOT et H. THOUVENOT. Ces *Annales*, 1952, **83**, 443.
- [18] A.-R. PRÉVOT, G. J. BÉAL, P. TARDIEUX. Ces *Annales*, 1950, **79**, 783.
- [19] A. R. PRÉVOT et M. HUET. Ces *Annales*, 1951, **80**, 94.
- [20] A.-R. PRÉVOT. *Rev. Belge Path. Med. Exp.*, 1951, **24**, 67.
- [21] J. DIAZ et E. ARJONA. *Bull. Inst. Med. Res. Madrid* 1949, **2**, 71.
- [22] P. BROUSTET, J. BRISOU et Ch. BERGE. Ces *Annales*, 1951, **81**, 686.
- [23] A. GRUMBACH et H. W. HOLTZ. *Schw. Z. allg. Path. Bakt.*, 1939, **2**, 230.
- [24] H. SEELIGER. *Arch. f. Hyg. u. Bakt.*, 1953, **137**, 1.

# VALEUR DU TEST DE L'URÉASE POUR LA DIFFÉRENCIATION DE *CL. SORDELLII* ET *CL. BIFERMENTANS*

par H. TATAKI et M. HUET (\*).

(Institut Pasteur. Service des Anaérobies.)

Appliquant aux bactéries anaérobies la technique de Roland et Bourbon pour la recherche des uréases, l'un de nous [1] signalait récemment que *Cl. sordellii* était l'une des rares espèces possédant le pouvoir d'hydrolyser l'urée et le conservant en culture, même après de nombreux passages. Au contraire, *Cl. bifementans*, pourtant très proche par l'ensemble de ses caractères, ne provoquait aucune hydrolyse.

On connaît les controverses qu'a suscitées le principe de la dualité de ces deux espèces [2]. Les premiers résultats ayant été obtenus avec les souches historiques de l'une et de l'autre, il convenait de rechercher si l'on pouvait les étendre et établir ainsi une loi générale.

## DÉTECTION DES URÉASES.

Nous avons suivi les mêmes modalités que précédemment : cultures jeunes sur milieu VF en fioles de Jaubert et Gory, culots recueillis par centrifugation, lavés deux fois à l'eau physiologique et repris dans  $1/2 \text{ cm}^3$  à  $1 \text{ cm}^3$  de milieu de Roland et Bourbon, puis portés à l'étuve à  $37^\circ$ . L'hydrolyse de l'urée se traduit par un virage au rouge du milieu.

Le test a été ainsi pratiqué sur toutes les souches de *Cl. sordellii* et *Cl. bifementans* de la Collection du Service des Anaérobies de l'Institut Pasteur. Malheureusement, si celles de la deuxième espèce sont fort nombreuses, il n'en est pas de même pour *Cl. sordellii* dont nous ne détenons, outre la souche 82 isolée par Sordelli, qu'une seule autre sûrement authentifiée.

Voici les résultats obtenus :

1° *Cl. sordellii*. Les 2 souches donnent une réaction positive presque instantanée.

(\*) Société Française de Microbiologie. Séance du 8 janvier 1953.

2° *Cl. bifermentans*. Sur 45 souches examinées :

37 n'ont donné aucune hydrolyse de l'urée ;

2 ont donné une réaction douteuse ;

6 ont donné une hydrolyse immédiate de l'urée.

Il apparaît donc que, si 82 p. 100 des souches de collection étiquetées *Cl. bifermentans* se comportent vis-à-vis de l'urée comme celles de Tissier et Martelly, 13 p. 100 possèdent une uréase facile à détecter.

Ces faits peuvent s'interpréter de plusieurs façons : on pourrait en conclure que la présence de cet enzyme est un caractère rare et inconstant dans l'espèce *bifermentans*, ou qu'il disparaît dans un grand nombre de cas au cours des repiquages. Il ne saurait alors être retenu comme critère de différenciation taxonomique.

Mais on sait que les caractères morphologiques, culturaux et biochimiques ne séparent pas *Cl. sordellii* et *Cl. bifermentans*, en sorte que le diagnostic différentiel de ces 2 espèces repose uniquement sur la présence ou l'absence de toxine. Or, le mécanisme de toute toxinogénèse est complexe et soumis à de nombreux facteurs souvent imparfaitement connus. D'autre part, la variabilité du pouvoir toxinogène d'une souche à l'autre de la même espèce est extrême. On ne saurait donc exclure que les souches les moins toxinogènes de *Cl. sordellii* aient pu être rattachées par erreur à l'espèce *Cl. bifermentans*. Ceci pourrait expliquer la présence assez paradoxale de souches possédant une uréase au sein d'une espèce non uréolytique et peut-être aussi les résultats de Clark et Hall [3], puis de Stewart [4] qui ont pu, dans certains cas, neutraliser la toxine de *Cl. sordellii* par des immunosérums obtenus à partir de certaines souches de *Cl. bifermentans*.

Pour les raisons que nous venons de donner, il nous a paru que l'étude sérologique de nos souches pourrait seule apporter quelque lumière sur ce point. Nous nous bornerons, dans cette note, à exposer les résultats des séro-agglutinations.

#### EPREUVES SÉROLOGIQUES.

A. PRÉPARATION DES IMMUNSÉRUMS. — *Cl. bifermentans*. — Souche TM. Les bactéries provenant de cultures de dix-huit heures en bouillon VF ont été centrifugées, remises en suspension en un volume égal d'eau physiologique et injectées par voie veineuse à 2 lapins. Chaque animal a reçu la première semaine 3 injections de 2 cm<sup>3</sup>, puis, après une semaine de repos, une nouvelle série de 3 injections de 5 cm<sup>3</sup> en une semaine. Huit jours après la dernière injection, le sang a été prélevé par saignée à blanc.

*Cl. sordellii*. — Souche 82. Les bactéries provenant de cultures

de dix-huit heures en bouillon VF ont été laissées au contact de 1 p. 100 de formol pendant vingt-quatre heures à 37°, puis lavées à l'eau physiologique et remises en suspension dans un volume égal à celui de la culture.

Deux lapins ont reçu par voie veineuse :

La première semaine : 2 injections de 0,2 cm<sup>3</sup> ;

La deuxième semaine : 2 injections de 0,5 cm<sup>3</sup> ;

La troisième semaine : aucune injection ;

La quatrième semaine : 2 injections de 1 cm<sup>3</sup>.

Le sang a été prélevé par saignée à blanc huit jours après la dernière injection.

B. SÉRO-AGGLUTINATIONS. — Les épreuves ont été pratiquées dans des conditions standard, en mettant en présence :

D'une part, des suspensions peu denses de bactéries en eau physiologique ;

D'autre part, des dilutions croissantes de sérum.

Une première lecture était faite après deux heures d'étuve à 37°, puis les tubes étaient laissés à la température ordinaire pendant vingt-quatre heures, et une deuxième lecture était faite.

Nous présentons ci-dessous les résultats concernant :

1° 2 souches de *Cl. sordellii*.

2° 6 souches de *Cl. bif fermentans* donnant une hydrolyse immédiate de l'urée.

3° 2 souches de *Cl. bif fermentans* donnant un test de l'uréase douteux.

4° 10 souches de *Cl. bif fermentans* n'hydrolysant pas l'urée.

Ces 10 souches comprennent la souche TM qui a servi à l'immunisation du lapin et 9 autres prises au hasard parmi les 37 dépourvues d'uréase.

L'ensemble de ces épreuves confirme qu'il existe entre les deux espèces *sordellii* et *bif fermentans* une communauté sérologique, ce que tous les travaux antérieurs avaient déjà affirmé [3, 4, 5].

Mais une autre constatation s'impose : la présence dans les groupes I et II d'un agglutinogène capable de s'unir spécifiquement aux agglutinines du sérum anti-*sordellii*, et dont les groupes III et IV sont dépourvus. Or, les groupes I et II sont précisément formés des souches qui ont une action positive immédiate sur l'urée, les groupes III et IV des souches qui ont une action douteuse ou nulle. En d'autres termes, les agglutinines de l'immunsérum anti-*sordellii* séparent l'ensemble de nos souches en deux familles sérologiques, qui se superposent exactement à celles que distingue le test de l'uréase.

Les agglutinines de l'immunsérum anti-*bif fermentans*, au contraire, semblent réagir de façon sensiblement égale avec toutes nos souches, quel que soit le groupe considéré. Tout se passe

	NOMBRE des souches	SÉRUM ANTI- <i>sordellii</i> 82		SÉRUM ANTI- <i>bifermenans</i> TM	
		Taux limite d'agglutination		Taux limite d'agglutination	
		en 2 heures	en 24 heures	en 2 heures	en 24 heures
I. <i>Cl. sordellii</i> .	82 G1	1/12 800 1/6 400	1/25 000 1/12 800	1/50 ±	1/100 ± 1/50 ±
II. <i>Cl. bifermenans</i> donnant une hydrolyse immédiate de l'urée.	667 444 233 D 221 II 442 Ca I	1/1 600 1/1 600 1/1 600 1/1 600 1/1 600 ±	1/3 200 1/3 200 1/3 230 1/3 200 1/3 200 1/3 200		1/1 600 1/200 1/200 1/400 ± 1/800 ± 1/1 600
III. <i>Cl. bifermenans</i> donnant un test de l'uréase douteux.	2 VI Ba 2 I		1/50 0		1/200 1/50
IV. <i>Cl. bifermenans</i> n'hydrolysant nullement l'urée.	TM Cheftel. HH 1 452 A 3 IC 1 453 E Cas 1 BS 1	1/50 ± — — — — — — — —	1/100 ± 0 0 0 0 1/50 ± 0 0	1/800	1/1 600 à 1/3 200 1/200 1/400 1/200 1/400 1/400 1/200 1/200 1/50 ±

N. B. — Le signe ± indique une réaction douteuse.

comme si elles s'unissaient à un autre agglutinogène commun aux deux espèces, mais soit peu abondant, soit masqué, soit encore altéré par l'action du formol, dans la souche *Cl. sordellii* 82 qui a servi à la production d'un immunisérum. L'aspect des réactions tend d'ailleurs à confirmer ce point de vue. Les agglutinations des groupes I et II par le sérum anti-*sordellii* ont toujours été rapides, donnant après deux heures d'étuve de fins granules très nettement distincts et qui se déposaient ultérieurement en laissant un surnageant parfaitement clair. Pour une seule souche, Ca I, la réaction a été de même type mais un peu plus tardive, n'apparaissant de façon nette que quelques heures après la sortie de l'étuve.

Les agglutinations par le sérum anti-*bifermenans* ont été généralement plus tardives, se produisant lentement après la sortie de l'étuve, excepté pour la souche homologue TM, qui donnait une agglutination très nette après deux heures à 37°. La réaction se traduisait par l'apparition, au sein de la suspension, de gros flocons facilement dissociables et qui déposaient lentement. Il est

à noter qu'elle était obtenue dans de bien meilleures conditions chaque fois que les suspensions étaient préparées à partir de cultures à la surface de géloses inclinées, scellées sous vide, et non par centrifugation de cultures en milieu liquide.

Ces constatations inclinent à penser qu'il pourrait s'agir d'un agglutinogène de surface, sinon flagellaire.

L'agglutination que certaines souches des groupes III et IV ont montré par contact avec le sérum anti-*sordellii* a toujours été faible, peu nette, se rapprochant des types de réactions obtenues avec le sérum anti-*bifementans* et très différentes de celles que le sérum anti-*sordellii* donnait avec les groupes I et II.

Il est certain qu'une étude plus approfondie de la constitution antigénique des espèces considérées sera nécessaire pour préciser ces données, mais on peut, d'ores et déjà, constater que la sérologie confirme la valeur du test de l'uréase dans le diagnostic différentiel d'un anaérobiose toxinogène de la gangrène gazeuse, *Cl. sordellii*.

#### CONCLUSIONS.

1° 2 souches authentiques de *Cl. sordellii* (dont la souche historique de Sordelli) sont fortement uréase-positives et toxinogènes.

2° 37 souches authentiques de *Cl. bifementans* (dont la souche historique de Tissier et Martelly) sont uréase-négatives et non toxinogènes.

3° 6 souches intermédiaires, étiquetées *Cl. bifementans* à cause de leur absence apparente de pouvoir toxinogène, se sont montrées uréase-positives. Elles appartiennent à un groupe sérologique apparenté à *Cl. sordellii*. Seule une étude ultérieure pourra permettre de les identifier de façon plus précise.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] M. HUET et N. ALADAME. Ces *Annales*, 1952, **82**, 766.
- [2] Cf. A.-R. PRÉVOT et P. CORDIER. Ces *Annales*, 1941, **67**, 473.
- [3] F. E. CLARK et J. C. HALL. *J. Bact.*, 1937, **33**, 23.
- [4] S. E. STEWART. *J. Bact.*, 1938, **35**, 13.
- [5] P. TARDIEUX et B. NISMAN. Ces *Annales*, 1952, **82**, 458.

**ÉTUDE *IN VITRO*  
DE LA MOTILITÉ DES POLYNUCLÉAIRES.  
SUR L'INFLUENCE EXERCÉE  
PAR DES ANESTHÉSIQUES LOCAUX  
ET DES HYPNOTIQUES**

par SUZANNE BAZIN et ALBERT DELAUNAY (\*).

(C. N. R. S. et Institut Pasteur, Annexe de Garches.)

**INTRODUCTION.**

La motilité est, du point de vue physiologique, une des propriétés fondamentales des leucocytes polynucléaires. On l'observe, *in vivo*, dans les phénomènes de diapédèse et on peut la mettre facilement en évidence, *in vitro*, par l'étude des phénomènes de chimiotactisme, selon la technique de J. Comandon [1]. Pour qu'un tactisme leucocytaire se manifeste normalement *in vitro*, il faut que se trouvent réunies plusieurs conditions :

1<sup>o</sup> Le milieu de suspension, dont la pression osmotique et le pH ne doivent pas s'écartez de certaines limites, doit, en outre, comme l'a montré l'un de nous [2, 3, 4], contenir à la fois des ions Ca<sup>++</sup> et de l'alexine.

2<sup>o</sup> Il est nécessaire, d'autre part, que les cellules soient dans un état biochimique normal ; en effet, si leur métabolisme vient à être troublé par l'action de substances chimiques de nature diverse, dont certaines peuvent jouer le rôle d'effecteurs d'enzymes [5, 6], les leucocytes deviennent incapables de se déplacer. Le phénomène persiste aussi longtemps que les substances en cause sont maintenues à leur contact, et il peut exister en l'absence de toute altération morphologique.

Pareille sensibilité des polynucléaires aux réactifs chimiques s'étend-elle à ces produits particulièrement actifs sur les cellules nerveuses, que sont les anesthésiques locaux et les hypnotiques, ou encore à des substances très actives sur le milieu sanguin comme l'héparine ? Les premiers sont-ils capables d'abolir l'activité chimiotactique des leucocytes et d'inhiber leur motilité à des

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 8 janvier 1953.

doses compatibles avec la vie cellulaire, comme ils suspendent la propagation de l'influx nerveux ? Et l'héparine, dont on connaît l'action inhibitrice sur l'étalement des thrombocytes [7], exerce-t-elle une action semblable à la surface des polynucléaires ? C'est ce que nous avons essayé de savoir par les expériences suivantes.

#### TECHNIQUE.

Pour nos expériences, nous avons utilisé des leucocytes inflammatoires de cobaye, obtenus par notre technique habituelle [2]. Ces leucocytes sont mis en suspension dans du sérum frais de cobaye au 1/2. Les suspensions sont ensuite mélangées à un volume égal de solutions de titre variable en substance à étudier, préparées dans du soluté isotonique de chlorure de sodium. Enfin, elles sont mises à l'étuve à 37°. Après le mélange, la concentration du milieu en leucocytes est de 8 000 cellules environ au millimètre cube.

Une goutte des diverses suspensions préparées est prélevée : 1<sup>o</sup> aussitôt après le mélange, 2<sup>o</sup> après trente minutes et 3<sup>o</sup> après soixante minutes d'incubation à 37°. Cette goutte est déposée sur une lame à la surface de laquelle ont été fixés, par dessiccation, des grains d'amidon de pomme de terre.

Après une heure de séjour à 37°, les suspensions leucocytaires sont centrifugées à faible vitesse. Les leucocytes, lavés au soluté isotonique de chlorure de sodium, sont ensuite remis en suspension dans du sérum frais de cobaye au 1/2. Une goutte de chacune des suspensions ainsi faites est placée finalement sur une lame recouverte d'amidon.

Toutes les préparations sur lame sont mises une heure à l'étuve à 37°, après avoir été lutées. Elles sont ensuite examinées au microscope, ce qui permettra d'apprecier l'intensité du tactisme et l'état morphologique des cellules.

Par ailleurs, sont étudiées les modifications possibles, sous l'influence des substances mises en expérience, du pH du milieu de suspension, de sa teneur en Ca<sup>++</sup>, et en complément.

#### RÉSULTATS.

I. ANESTHÉSIQUES LOCAUX. — Substances étudiées : Chlorhydrate de cocaïne, chlorhydrate de *p*.aminobenzoyldiéthylaminoéthanol (Novocaïne), chlorhydrate de diéthylaminodiméthylacétanilide (Xylocaïne).

Les concentrations provoquant une *inhibition réversible de la motilité leucocytaire*, c'est-à-dire une inhibition suivie, après lavage et remise des cellules dans du sérum frais, d'un retour à la motilité naturelle, sont M/100 pour la cocaïne, de M/25 à M/100 pour la Xylocaïne. Pour la Novocaïne, nous n'avons

trouvé aucune concentration active qui permette la reprise de mouvements amiboïdes, après lavage des cellules.

Les concentrations inhibant la motilité leucocytaire, sans réversibilité par lavage, c'est-à-dire provoquant une altération définitive des cellules, sont M/50 pour la cocaïne et la Novocaïne, M/10 pour la Xylocaine.

Pour les trois anesthésiques étudiés, on constate que plus le temps de contact avec les cellules est prolongé, plus les concentrations faibles se montrent actives sur la motilité leucocytaire.

Aucune des trois substances n'a modifié sensiblement le pH du milieu de suspension et n'a changé sa teneur en ions  $\text{Ca}^{++}$  et en complément.

**II. BARBITURIQUES.** — Substances étudiées : Diéthylmalonylurée sodique (Véronal sodique), Phényléthylmalonylurée sodique (Gardénal sodique), Ethylméthylbutylthiomalonylurée sodique (Penthal).

*L'inhibition réversible* de la motilité leucocytaire a été ici obtenue à des concentrations allant de M/25 à M/100 pour le Véronal sodique, de M/10 à M/50 pour le Gardénal sodique, de M/25 à M/500 pour le Penthal.

*Une inhibition irréversible* n'a été observée qu'à la concentration de M/10 pour le Véronal sodique et le Penthal. Pour le Gardénal sodique, la même concentration permet un retour à la motilité normale après lavage, et des concentrations plus élevées ne peuvent pas être essayées en raison de la faible solubilité du produit.

Dans tous les cas, l'action sur le tactisme des globules blancs s'est produite dès la mise au contact des substances et des cellules.

Les deux premiers produits (Véronal et Gardénal sodiques) alcalinisent le milieu de suspension jusqu'à pH 8,5, pour les solutions les plus concentrées. Cependant, il ne semble pas que cette modification du pH soit suffisante, à elle seule, pour entraîner une diminution de la motilité, car des essais effectués avec le Véronal (non sodique) qui ne change pas le pH du milieu et dont la solubilité permet de préparer une solution M/100 ont donné des résultats exactement comparables à ceux obtenus avec le même dérivé sodique, plus soluble.

Les barbituriques étudiés sont sans action sur le  $\text{Ca}^{++}$  du milieu. En revanche, l'un d'eux, le Penthal, détruit totalement le complément. Pour cette dernière substance, on ne peut donc pas dire si son influence s'exerce directement sur les cellules ou seulement par l'intermédiaire de la diminution de l'alexine.

**III. ANTIHISTAMINIQUES.** — Chlorhydrate de diméthylaminométhylphénothiazine (Phénergan), Hydrate de phénothiazinylpropyl-

triméthylammonium (Multergan). Chlorhydrate de phénylbenzylaminométhylimidazoline (Antistine). Chlorhydrate de diméthylaminométhoxylbenzylpyridine (Néo-Antergan).

*L'inhibition réversible* de la motilité, en ce cas, a été observée seulement pour le Phénergan à des concentrations comprises entre M/2 500 et M/5 000 et, pour le Néo-Antergan, entre M/1 000 et M/2 500. Pour l'Antistine, nous n'avons obtenu qu'un retour partiel de la motilité à M/1 000, et aucune réversibilité ne fut observée, après lavage, dans le cas du Multergan.

*L'inhibition irréversible* de la motilité leucocytaire a été obtenue pour une concentration de M/2 500 de Phénergan, et M/100 de Multergan, M/500 d'Antistine et de Néo-Antergan.

Aucune de ces substances ne modifie le pH du milieu de suspension, aux concentrations utilisées. Elles n'interviennent pas davantage sur la teneur en ions  $\text{Ca}^{++}$  et en complément du sérum.

**IV. HÉPARINE.** — Aux concentrations faibles, l'héparine ne modifie pas la motilité leucocytaire. Aux concentrations fortes, comprises entre 5 et 10 mg par millilitre, le tactisme est aboli, mais redevient normal après lavage et remise dans du sérum frais.

A ces doses élevées, l'héparine ne change pas le pH du milieu et ne touche pas davantage aux ions  $\text{Ca}^{++}$ . Cependant, le complé-

#### Inhibition

CONCENTRATION	M/10	M/25	M/50	M/100
<b>Anesthésiques locaux :</b>				
Chlorhydrate de cocaïne . . . . .	Irréversible.	Réversible.	Irréversible.	Réversible.
Novocaine . . . . .				Nulle.
Xylocaïne . . . . .				Réversible.
<b>Barbituriques :</b>				
Véronal sodique . . . . .	Irréversible.	Réversible.	Réversible.	Réversible.
Gardénal sodique. . . . .	Réversible.	Réversible.	Réversible.	Nulle.
Penthalal . . . . .	Irréversible.	Partiellement réversible.	Réversible.	Réversible.
<b>Anti-histaminiques :</b>				
Phénergan . . . . .				
Multergan . . . . .				
Antistine . . . . .				
Néo-Antergan . . . . .				
<b>Concentration (par cm<sup>3</sup>) . . . . .</b>	<b>10 mg</b>	<b>5 mg</b>	<b>2,5 mg</b>	
Héparine . . . . .	Réversible.	Réversible.	Nulle.	

ment se trouve complètement inhibé. On doit évidemment tenir compte de cette action de l'héparine sur le milieu intercellulaire, lorsqu'on étudie son influence sur la motilité leucocytaire.

L'ensemble de nos résultats sur l'inhibition de la motilité leucocytaire est résumé dans le tableau ci-dessous.

#### DISCUSSION.

De ces résultats se dégagent les notions suivantes :

1<sup>o</sup> La plupart des substances étudiées provoquent, *aux doses faibles*, une *inhibition* de la motilité leucocytaire, *réversible* par lavage des cellules. Aux *doses fortes*, au contraire, elles produisent une *inhibition irréversible*, mais cela sans qu'on puisse déceler, le plus souvent, une modification quelconque de la structure cellulaire.

L'inhibition réversible semble correspondre à une action ménagée sur la cellule, l'inhibition irréversible étant la première phase d'une action toxique qui aboutit aux doses encore plus élevées, à une atteinte manifeste, puis à la destruction complète de la structure cellulaire.

2<sup>o</sup> Au cours de nos expériences, une substance, le Gardénal sodique, n'a pas provoqué d'inhibition irréversible, même aux

#### ité leucocytaire.

/250	M/500	M/1 000	M/2 500	M/5 000	M/10 000
ulle.					
ulle.					
ulle.					
versible.	Réversible.	Nulle.			
ulle.					
ulle.					
versible.					
ulle.					
ulle.	Irréversible.	Partiellement réversible.	Irréversible.	Réversible.	Nulle.
...		Réversible.	Nulle.		
...	Irréversible.			Nulle.	

doses les plus fortes. Nous pensons toutefois qu'une abolition définitive de la motilité aurait pu être obtenue, si des concentrations plus élevées que celles permises par la faible solubilité du produit avaient pu être essayées.

3° D'autres substances (Novocaïne, Multergan) ont provoqué une inhibition irréversible, à toutes les doses qui se montrent actives sur la motilité leucocytaire. Ces substances paraissent donc particulièrement toxiques pour les leucocytes. Sans doute sont-elles fixées d'une manière très énergique sur ces cellules, puisque le lavage ne parvient pas à faire disparaître leur action.

4° La différence entre la dose inactive et la dose qui produit une inhibition irréversible (c'est-à-dire la zone des concentrations où se produit l'inhibition réversible) varie dans une large mesure d'une substance à l'autre. On peut penser que plus cette marge de concentrations est étendue, autrement dit plus l'action毒ique sur les cellules est graduée, moins l'effet sur les cellules est brutal. C'est le cas de la Xylocaïne et des barbituriques.

5° *Les concentrations actives sur la motilité leucocytaire sont très variables.* Elles sont particulièrement faibles ( $M/5\ 000$  et  $M/2\ 500$ ) pour certains anti-histaminiques (Phérgan, Néo-Antergan), ce qui suggère l'existence de modes d'action différents pour ces diverses substances.

6° Indépendamment des différences de concentrations actives, les substances étudiées se distinguent encore par l'influence du temps de contact sur leur activité. Certaines d'entre elles (anesthésiques locaux, Multergan, Antistine) modifient la motilité d'autant plus lentement que la concentration utilisée est plus faible, alors que pour les autres produits, l'action maximum, pour une concentration donnée, est obtenue d'emblée, soit dès la mise au contact des cellules. Remarquons que les substances dont l'action s'accroît avec le temps sont également celles qui conduisent le plus souvent à une inhibition irréversible de la motilité. A notre avis, cela tient, pour de telles substances, à une pénétration intracellulaire progressive.

Au contraire, les substances dont l'action est immédiate agissent probablement sans pénétrer à l'intérieur de la cellule. On peut penser alors soit à une adsorption superficielle, soit à une combinaison plus ou moins labile avec certains constituants de la couche limitante cellulaire.

Cette interprétation trouve d'ailleurs un appui dans les précédentes études de l'un de nous, d'une part sur les cellules végétales [8] (à l'intérieur de celles-ci, les anesthésiques locaux pénètrent beaucoup mieux que les barbituriques) et, d'autre part, sur les hématies [9] (dont la surface retient les barbituriques par adsorption).

7° Un cas particulièrement intéressant à considérer est celui

offert par les substances actives à très faible concentration, comme le Phénergan et le Néo-Antergan. Sans doute se trouve-t-on ici devant un mode d'action particulier ; peut-être s'agit-il d'une interaction entre les molécules de ces substances et un nombre relativement restreint de molécules réceptrices entrant dans la structure de la surface limitante cellulaire. Remarquons, de toutes façons, que l'effet produit par des substances antihistaminiques sur la motilité leucocytaire paraît différent de celui exercé sur la conservation de la structure des cellules sanguines [40, 41]. Celle-ci semble liée à la présence du noyau phénothiazine [40] ; l'inhibition du tactisme leucocytaire peut être, à l'opposé, déterminée par des antihistaminiques de structure chimique diverse.

8° Reste à discuter nos observations sur l'héparine. Nous n'avons pas été capables de retrouver à propos des leucocytes, avec cette substance, un effet aussi spectaculaire que celui qu'elle exerce sur les thrombocytes.

Pour supprimer la motilité leucocytaire *in vitro* par l'héparine, il faut employer, en effet, des doses considérables. Au surplus, ces doses ne semblent pas agir directement sur les cellules, mais simplement en détruisant l'alexine du milieu.

#### RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

1° Des anesthésiques locaux (cocaine, Novocaïne, Xylocaïne), des barbituriques (Véronal, Gardénal sodiques, Penthal), des antihistaminiques (Phénergan, Multergan, Antistine, Néo-Antergan), ajoutés *in vitro* à des suspensions leucocytaires peuvent, sans tuer les cellules (du moins sans altérer apparemment leur structure), produire une inhibition, réversible ou irréversible selon les cas, de la motilité cellulaire.

2° Dans quelques cas (Penthal, Héparine) cet effet semble être secondaire à la destruction du complément dans le milieu. Le plus souvent, il paraît dû à une modification (chimique ou physico-chimique) plus ou moins profonde de la couche limitante des cellules.

3° D'un spécial intérêt, nous paraît être l'action ici exercée par certains antihistaminiques (Phénergan, Néo-Antergan), car elle se fait sentir à des concentrations de produits comparativement très faibles.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. COMANDON. Ces *Annales*, 1920, 34, 1.
- [2] A. DELAUNAY. Ces *Annales*, 1944, 70, 372.
- [3] A. DELAUNAY et J. PAGES. Ces *Annales*, 1946, 72, 458.
- [4] A. DELAUNAY et J. PAGES. *Rev. Immunol.*, 1946, 10, 33.

- [5] J. LEBRUN, PAGES et R. ROBINEAUX. Ces *Annales*, 1950, **79**, 416.
- [6] J. LEBRUN et A. DELAUNAY. Ces *Annales*, 1951, **80**, 1.
- [7] J. ROSKAM. Communication personnelle.
- [8] J. RÉGNIER et S. BAZIN. *C. R. Soc. Biol.*, 1940, **133**, 65.
- [9] S. BAZIN. *C. R. Soc. Biol.*, 1949, **143**, 345.
- [10] B.-N. HALPERN, B. DREYFUS et G. BOURDON. *La Presse Méd.*, 1950, **58**, 1151.
- [11] R. CHARY. *Le Sang*, 1951, **22**, 307.

## L'HEMAGGLUTINATION PASSIVE DANS LA RECHERCHE DES ANTICORPS ANTIPROTÉIQUES (\*)

par A.-G. BORDUAS (\*\*) et P. GRABAR.

(*Institut Pasteur. Service de Chimie Microbienne.*)

Depuis les travaux de Keogh et ses collaborateurs [1], puis ceux de Middlebrook et Dubos [2], plusieurs chercheurs ont réussi à fixer des antigènes bactériens de nature polyosidique sur des hématies. Les globules rouges (G. R.) ainsi sensibilisés deviennent spécifiquement agglutinables par les immunserums correspondants, souvent à de hautes dilutions, et peuvent être avantageusement utilisés pour évaluer la richesse en anticorps de ces sérums. Plus récemment, Boyden [3] a apporté une modification importante à cette technique et a constaté que même des antigènes de nature protéidique peuvent être fixés sur des hématies de mouton à la condition que ceux-ci soient préalablement traités par de l'acide tannique très dilué. Nous avons pris connaissance de cette méthode, au cours de travaux que nous poursuivions sur le système ovalbumine-anticorps homologue. Il nous a paru intéressant de mettre à profit cette dernière technique dans la recherche des anticorps qu'on ne parvient pas à faire précipiter parce qu'ils donnent des complexes solubles ou sont en concentration insuffisante.

Après avoir vérifié les observations de Boyden avec le système ovalbumine-sérum de lapin anti-ovalbumine et avoir précisé quelques possibilités de la méthode, nous l'avons utilisée, avec quelques modifications, pour voir s'il ne nous serait pas possible de doser les anticorps non précipitants qu'un épuisement progressif, par de petites portions d'antigène (méthode de Heidelberger et Kendall [4]), laisse en solution. Nous avons donc essayé de suivre, à l'aide de cette méthode, l'épuisement progressif de sérums de lapin anti-ovalbumine par l'adjonction de petites quantités d'ovalbumine, et nous avons constaté que : 1° La quantité

(\*) Une partie de ce travail a fait l'objet d'une communication au II<sup>e</sup> Congrès international de Biochimie en juillet 1952 (voir « Résumés des communications », p. 382).

(\*\*) De l'Institut de Microbiologie et d'Hygiène de l'Université de Montréal.

totale d'ovalbumine ainsi ajoutée pouvait dépasser largement le point d'équivalence du sérum, sans que le taux d'hémagglutination du surnageant soit sensiblement abaissé ; 2° Pour différents sérum anti-ovalbumine la quantité d'azote précipité au point d'équivalence ne variait pas parallèlement au taux d'hémagglutination trouvé ; 3° La quantité minimum d'ovalbumine nécessaire pour obtenir le maximum de sensibilisation des G. R. était énorme, si on la compare aux quantités nécessaires pour d'autres systèmes.

Ces observations nous portaient à croire que le système intéressé dans l'hémagglutination passive n'était pas l'ovalbumine et les anticorps anti-ovalbumine, mais une impureté de l'antigène, que nous avons pu démontrer être la conalbumine, et l'anticorps correspondant (1). L'étude quantitative de ce dernier système nous a permis de préciser la concentration limite d'anticorps nécessaire pour donner une hémagglutination positive et d'évaluer le nombre de molécules d'anticorps fixées par chaque globule rouge agglutiné. Des travaux analogues avec un sérum de cheval anti-sérumalbumine humaine nous ont permis d'observer des phénomènes de zone très marqués et de constater l'activité des complexes solubles obtenus dans la zone d'excès d'antigène.

### I. — MATÉRIEL.

1° GLOBULES ROUGES DE MOUTON. — Nous avons utilisé dans ce travail des G. R. de mouton. On prélève aseptiquement du sang de mouton que l'on conserve dans 1,2 volumes de solution d'Alsever modifiée [5] dont voici la composition :

Glucose . . . . .	2,05 g
Citrate de sodium. . . . .	0,8 g
Chlorure de sodium . . . . .	0,42 g
Eau bidistillée. . . . .	100 ml

On acidifie cette solution avec de l'acide citrique à 10 p. 100, jusqu'à pH 6,1 et on stérilise par filtration sur bougie. Il est préférable de laisser vieillir au moins deux jours les globules à la glacière avant de les utiliser ; ils peuvent ensuite servir pendant quelques semaines. Il faut cependant se rappeler que les G. R. traités à l'acide tannique sont très fragiles et qu'il vaut mieux travailler avec des globules aussi frais que possible. Nous

(1) Dans une publication antérieure [43] nous avons admis que l'agglutination des G. R. tannés et sensibilisés par de l'ovalbumine par les sérum de malades sensibilisés au blanc d'œuf est due à l'ovalbumine. Les recherches relatées dans ce mémoire montrent qu'il s'agit en réalité d'un autre constituant du blanc d'œuf, probablement de la conalbumine.

préférons maintenant renouveler notre réserve de G. R. toutes les semaines, les résultats sont ainsi plus constants.

Nous avons tenté d'utiliser des G. R. humains du groupe « O », mais ces globules, plus fragiles que ceux du mouton, supportent très mal le traitement à l'acide tannique, tel que décrit, et les tubes témoins n'ont pas été satisfaisants.

2<sup>e</sup> ANTIGÈNES. — Les solutions d'ovalbumine ont été obtenues à partir de préparations d'ovalbumine de poule cristallisées par addition de sulfate d'ammonium à plusieurs reprises par M<sup>me</sup> M. Kaminski. Ces solutions sont électrophorétiquement pures ; immunologiquement, elles contiennent de la conalbumine comme impureté.

Les solutions de conalbumine étaient obtenues par dissolution de cristaux du dérivé ferrique de conalbumine, qui nous a été obligeamment fourni par M. R.-C. Warner. N.-Y. Univ. Coll. of Medicine.

La sérumalbumine humaine purifiée par précipitation à l'alcool nous a été donnée par le Dr Van Loghem, d'Amsterdam. Nous l'en remercions. Cette préparation est électrophorétiquement pure, mais par voie immunochimique on y trouve au moins 4 impuretés en petite quantité.

3<sup>e</sup> IMMUNSÉRUMS. — Les sérums de lapin anti-ovalbumine et anti-conalbumine ont été préparés et titrés par M<sup>me</sup> M. Kaminski par les méthodes habituelles.

Le sérum de cheval anti-sérumalbumine humaine (S-31-III) est le même que celui employé dans des recherches sur la sérumalbumine [42] ; il est particulièrement riche en anticorps : 20 mg par millilitre.

La plupart des résultats que nous rapportons dans ce mémoire ont été obtenus avec des sérums inactivés à 56° C pendant une demi-heure ; on peut cependant, avec des sérums quelque peu vieillis, omettre cette opération. On élimine ensuite de ces sérums les agglutinines naturelles anti-mouton. On y arrive facilement en opérant sur du sérum dilué au 1/10, auquel on ajoute un volume de G. R. égal au 1/10 du volume du sérum dilué. On laisse en contact à la température du laboratoire environ une demi-heure et centrifuge quelques minutes vers 2 000 T. P. M. Dans le tube témoin contenant des G. R. normaux en présence de la plus faible dilution du sérum essayé, on ne doit pas observer d'agglutination. Les dilutions des sérums ont été effectuées soit dans du sérum normal de lapin dilué au 1/100 (eau physiologique) préalablement chauffé trente minutes à 56° C et épuisé par des G. R. normaux de mouton, soit dans du Subtosan de la Maison Spécia (solution isotonique à 3,5 p. 100

de polyvinylpyrrolidone) dilué au 1/10 dans de l'eau physiologique.

**4° TAMPONS PHOSPHATES ISOTONIQUES.** — Solution tampon n° 1 : pH 6,4. A 28 ml d'une solution de  $\text{PO}_4\text{KH}_2$ , 0,15 M, on ajoute 12 ml d'une solution de  $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$ , 0,15 M et 40 ml d'eau physiologique.

Solution tampon n° 2 : pH 7,2. Pour 12 ml d'une solution de  $\text{PO}_4\text{KH}_2$ , 0,15 M, on ajoute 28 ml d'une solution de  $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$ , 0,15 M et 40 ml d'eau physiologique.

**5° ACIDE TANNIQUE A 1/20 000.** — Nous n'avons utilisé que l'acide tannique de Rhône-Poulenc précipité à l'alcool (2). L'acide tannique s'altère rapidement en solution diluée et, pour obtenir des résultats constants, nous croyons qu'il est préférable d'utiliser chaque jour une solution fraîche d'acide tannique à 1/20 000 dans de l'eau physiologique.

## II. — TECHNIQUES.

Nous avons suivi la technique décrite par Boyden, dont voici les grandes lignes.

**a) LAVAGE DES GLOBULES ROUGES.** — Les G. R. de mouton, conservés dans la solution d'Alsever, sont séparés du liquide qui les baigne par centrifugation à une vitesse relativement faible (2 000 T. P. M.) pendant cinq minutes, puis lavés trois fois en remettant délicatement en suspension les globules sédimentés dans un volume d'eau physiologique égal au volume initial de la suspension. Pour éviter les dangers d'hémolyse, nous avons préféré utiliser chaque jour des globules fraîchement séparés de la solution conservatrice.

**b) TRAITEMENT DES HÉMATIES PAR L'ACIDE TANNIQUE.** — A un volume (2 ml) d'une suspension de G. R. de mouton à 2,5 p. 100 dans du tampon phosphate isotonique (pH 7,2), on ajoute 1 volume (2 ml) d'une solution fraîche d'acide tannique à 1/20 000 et on laisse en contact pendant dix minutes. On centrifuge ensuite pendant quelques minutes à environ 1 500 T. P. M., on lave une fois dans un volume (2 ml) de tampon phosphate isotonique (pH 7,2) et on remet finalement les G. R. en suspension dans un volume (2 ml) d'eau physiologique.

(2) Quelques essais ont pu être effectués avec un acide tannique pur que nous devons à l'obligeance du Dr Carraz et qui provient de la Maison Carlo Erba, de Milan. Les résultats obtenus ont été analogues, mais la concentration optimale du tannin a été plus élevée.

c) SENSIBILISATION DES HÉMATIES PAR L'ANTIGÈNE. — A un volume (2 ml) de la suspension de G. R. traités à l'acide tannique, on ajoute 4 volumes (8 ml) d'une solution de concentration appropriée de l'antigène dans un tampon phosphate isotonique à pH 6,4. On laisse en contact quinze minutes à la température du laboratoire, puis on centrifuge vers 1 500 T. P. M. pendant environ cinq minutes et on lave deux fois dans un volume (2 ml) de sérum de lapin normal dilué à 1/250 (eau physiologique) préalablement inactivé et épuisé par des G. R. normaux de mouton, ou dans du Subtosan dilué au 1/10 dans de l'eau physiologique. Les G. R. ainsi sensibilisés et lavés sont alors remis en suspension dans un volume (2 ml) de sérum de lapin normal à 1/250 ou de Subtosan à 1/10.

d) TECHNIQUE DE LA RÉACTION. — Dans une série de tubes à hémolyse (3) on introduit 0,5 ml des dilutions croissantes du sérum à essayer et 0,05 ml (1 goutte) de la suspension de G. R. sensibilisés. Un témoin (T. S.) contenant 0,5 ml de la plus faible dilution du sérum en présence de la même quantité de G. R. normaux confirme l'épuisement du sérum en agglutinines anti-mouton. Un deuxième tube témoin (T. G. R.) contenant 0,5 ml du diluant utilisé (sérum de lapin normal au 1/100 ou Subtosan au 1/10) en présence de 0,05 ml de G. R. sensibilisés sert de point de comparaison dans la lecture de la réaction. On agite délicatement les tubes qu'on laisse sédimenter toute la nuit, à la température du laboratoire.

La lecture des résultats doit se faire en regardant le fond des tubes dans un miroir concave. Les globules non sensibilisés mis en présence d'un sérum épousseté en agglutinines anti-mouton (T. S.) forment, après sédimentation, une pastille bien délimitée au centre du tube. Par contre, les globules sensibilisés mis en présence du sérum de lapin normal au 1/100 ou de Subtosan au 1/10 (T. G. R.) sédimentent en forme d'anneau, que l'on retrouve d'ailleurs avec les hautes dilutions (réaction négative) d'un immunisé, cependant que pour les dilutions du même sérum où la réaction est positive, les G. R. sédimentés recouvrent le fond du tube d'une mince couche présentant parfois des granulations. Une légère agitation des tubes, même fortement positifs, remet facilement les G. R. en suspension et seule leur disposition au fond du tube permet de constater l'hémagglutination. Même l'examen sous microscope ne permet pas de distinguer les suspensions des tubes témoins de celles des tubes fortement positifs après une légère agitation.

(3) Ces tubes doivent être très propres ; nous les lavons à l'acide chromique.

## III. — RÉSULTATS.

1<sup>o</sup> *CONTROLE DE LA MÉTHODE.* — a) *Sensibilité et fidélité de la méthode.* — Au moment où avait paru la publication de Boyden, nous tentions, déjà depuis quelque temps, d'appliquer la technique de Middlebrook et Dubos au système ovalbumine-sérum de lapin anti-ovalbumine. Nous étions donc très heureux de vérifier que des G. R. préalablement traités par de l'acide tannique et sensibilisés par une solution d'ovalbumine (contenant comme impureté de la conalbumine) étaient agglutinés avec un sérum de lapin hyperimmunisé contre cet antigène à la dilution 1/10 000 mais non à 1/100 000. Par contre, le même système, dans des conditions analogues, ne donne aucune agglutination même dans le tube contenant du sérum non dilué si les G. R. sont sensibilisés sans avoir préalablement été traités à l'acide tannique. Voulant préciser entre les dilutions 1/10 000 et 1/100 000, nous sommes arrivés à la conclusion qu'on ne pouvait guère espérer faire mieux que de situer le titre entre les dilutions 1/30 000 et 1/40 000. Le même sérum titré plusieurs fois nous a convaincus rapidement de la fidélité de la méthode.

b) *Lavage des globules rouges sensibilisés.* — Boyden propose un seul lavage des G. R. sensibilisés pour éliminer l'excès d'antigène qui est susceptible d'abaisser le taux d'hémagglutination. Cette précaution nous a paru insuffisante, étant donné la forte concentration de l'antigène proposée (10 mg ovalbumine pour 2 ml de G. R. à 2,5 p. 100) et nous avons voulu nous rassurer sur l'efficacité du lavage. Nous avons toutefois constaté qu'on obtient le même titre en utilisant des G. R. lavés une seule fois ou lavés trois fois. Un seul lavage semble donc suffisant, mais nous préférons quand même, par mesure de précaution, laver deux fois.

c) *Diluants.* — Les globules tannés, puis sensibilisés par l'antigène sédimentent très mal dans de l'eau physiologique et Boyden propose, comme diluant de l'immunsérum, du sérum de lapin normal dilué au 1/100. Nous avons, de cette façon, obtenu d'excellents résultats. Cependant, ce matériel se conserve assez mal et peut facilement compromettre le résultat d'un essai s'il contient encore des agglutinines anti-mouton ou s'il doit être utilisé avec des sérum d'espèces animales différentes avec lesquels il est susceptible de réagir. Pour le remplacer, nous avons essayé le Subtosan, la gélatine, la sérumalbumine bovine, la gomme arabique et la gomme sénégal. De toutes ces substances, seul le Subtosan dilué au 1/10 (c'est-à-dire une solution de polyvinyl-pyrrolidone à 0,35 p. 100 dans de l'eau physiologique) donne des résultats convenables et peut avantageusement remplacer le sérum normal.

d) Quantité d'ovalbumine fixée sur les globules rouges. — La concentration d'ovalbumine nécessaire pour sensibiliser au maximum les G. R. (10 mg pour 2 ml de suspension à 2,5 p. 100) nous paraissait très élevée et nous étions curieux de voir si la quantité d'ovalbumine adsorbée était considérable. Connaissant la teneur en ovalbumine de la solution utilisée pour sensibiliser les G. R., il nous était facile d'évaluer la quantité d'antigène adsorbée en dosant l'azote de la solution surnageante après centrifugation. Voici les résultats auxquels nous sommes ainsi arrivés :

	OVALBUMINE	
	Ajoutée	Récupérée
Globules rouges à 2,5 p. 100 :		
2 ml traités par l'acide tannique . . . . .	10,0 mg	9,88 mg
2 ml non traités par l'acide tannique . . . . .	10,0 mg	9,50 mg

On peut donc conclure que la quantité d'ovalbumine adsorbée est très faible, certainement trop faible pour qu'on puisse l'évaluer par cette méthode. Mais alors pourquoi faut-il tant d'ovalbumine pour sensibiliser les G. R. s'il y en a si peu qui s'adsorbe, à moins que la substance active ne soit une impureté de la préparation utilisée ?

2° ESSAIS AVEC L'OVALBUMINE ET LA CONALBUMINE. — a) *Comparaison entre le taux d'hémagglutination et le maximum de précipitation par l'ovalbumine de quelques sérum de lapins anti-ovalbumine.* — Nous avons déjà signalé que le taux d'hémagglutination ne variait pas parallèlement au maximum de précipitation par l'ovalbumine pour différents sérum essayés. Voici quelques résultats qui sont assez démonstratifs.

NUMÉRO DES SÉRUMS	QUANTITÉ d'OV/ml de sérum au point d'équivalence en µg	HÉMAGGLUTINATION	
		Dilution positive	Dilution négative
I . . . . .	250	1 : 60 000	1 : 70 000
II . . . . .	450	1 : 50 000	1 : 60 000
III . . . . .	450	1 : 40 000	1 : 50 000
IV . . . . .	750	1 : 200 000	1 : 300 000

Il aurait été intéressant de vérifier, avec ces sérumis, le parallélisme entre le maximum de précipitation par la conalbumine et le taux d'hémagglutination, malheureusement ces sérumis étaient

déjà épuisés quand nous avons constaté le rôle de la conalbumine dans l'hémagglutination.

b) *Epuisement progressif des sérums de lapin anti-ovalbumine par l'ovalbumine.* — Les divergences observées entre le taux d'hémagglutination et le maximum de précipitation dont nous venons de parler pouvaient s'expliquer, en partie tout au moins, en admettant que les anticorps dits bloquants ou incomplets, dont la teneur peut facilement varier d'un sérum à l'autre, provoquent, au même titre que les anticorps précipitants, l'agglutination des G. R. sensibilisés. Nous avons donc titré, par hémagglutination passive, les liquides surnageants obtenus après l'addition successive de plusieurs petites portions d'ovalbumine et nous avons constaté que pour inhiber à peu près complètement l'hémagglutination passive, il nous fallait ajouter des quantités trop considérables d'ovalbumine (pouvant aller jusqu'à 300 p. 100 de la quantité calculée pour le maximum de précipitation) pour que cette hypothèse fût plausible. En effet, il faudrait admettre que dans ce cas particulier il y avait au moins trois fois plus d'anticorps bloquants ou incomplets que d'anticorps précipitants. La conclusion que l'ovalbumine n'agit que par sa teneur en impuretés (conalbumine) était à envisager.

c) *Sensibilisation des globules rouges par la conalbumine.* — Les constatations plus ou moins imprévues que nous venons de signaler nous ont amenés à rechercher l'activité de certaines impuretés naturelles de l'ovalbumine dans la sensibilisation des G. R.

Nous avons ainsi constaté que non seulement la conalbumine sensibilise les G. R. comme le fait la solution impure d'ovalbumine déjà utilisée, mais qu'elle est beaucoup plus active que celle-ci puisqu'on peut obtenir le même taux d'hémagglutination en n'utilisant qu'environ 3 p. 100 (78 µg au lieu de 2 500) de la quantité nécessaire pour obtenir le maximum de sensibilisation avec l'ovalbumine impure (tableau 1).

Ces résultats sont assez suggestifs et cadrent très bien avec les observations déjà faites à l'électrophorèse et par des études immunologiques que certaines préparations d'ovalbumine imparfaitement purifiée contiennent de 3 à 5 p. 100 de conalbumine. Toutefois, nous ne pouvions éliminer avec certitude la possibilité de deux réactions distinctes, l'une mettant en œuvre les anticorps anti-ovalbumine et l'autre les anticorps anti-conalbumine, lesquels auraient pu, par hasard, donner un taux d'hémagglutination identique au taux observé avec l'ovalbumine.

d) *Action comparée de la conalbumine et de l'ovalbumine dans l'inhibition de la réaction d'hémagglutination.* — Pour éliminer définitivement l'hypothèse que l'ovalbumine puisse jouer un rôle dans la réaction d'hémagglutination passive, nous avons

TABLEAU 1. — Activités comparées de la conalbumine et de l'ovalbumine dans la sensibilisation des globules rouges pour le test d'hémagglutination passive d'un sérum de lapin anti-ovalbumine impure.

Séries	Dilutions du sérum				Témoin globules rouges	$\mu\text{g}$ d'antigène pour sensibiliser 1 ml de suspension de G.R. à 2,5%
	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$		
1	-	-	-	-	-	54
2	+	+	-	-	-	109
3	+	+	-	-	-	218
4	+	+	-	-	-	437
5	+	+	-	-	-	875
6	+	+	-	-	-	1.750
7	+	+	-	-	-	2.500
8	+	+	-	-	-	5.000
9	+	+	-	-	-	10.000
10	+	+	-	-	-	2,5
11	+	+	-	-	-	4,8
12	+	+	-	-	-	9,7
13	+	+	+	-	-	19,5
14	+	+	+	-	-	38,9
15	+	+	+	-	-	78
16	+	+	+	-	-	156
17	+	+	+	-	-	312
18	+	+	+	-	-	625

effectué l'expérience suivante. A deux tubes, contenant chacun 2 ml d'une suspension de G. R. à 2,5 p. 100 préalablement traités par l'acide tannique, on ajoute, dans l'un, 5 mg d'ovalbumine et, dans l'autre, 156  $\mu\text{g}$  de conalbumine (quantités optimum pour chacun des deux produits) dilués dans 8 ml de tampon phosphate isotonique à pH 6,4. Après un contact d'environ quinze minutes, on centrifuge et on lave soigneusement par deux fois les G. R. sensibilisés dans du Subtosan dilué au 1/10. On prépare ensuite deux séries de tubes dans lesquels on introduit : dans le premier tube de chaque série, 0,25 ml d'une solution d'ovalbumine à la concentration de 1 mg par millilitre et, dans les tubes suivants, 0,25 ml des dilutions au 1/10, au 1/100, etc., de cet antigène. On procède de la même façon pour deux autres séries de tubes dans lesquels on introduit les mêmes quantités de conalbumine. On ajoute ensuite à chacun de ces tubes 0,25 ml d'une dilution à 1 pour 5 000 d'un sérum que l'on sait actif

à 1 pour 200 000, puis 1 goutte de G. R. sensibilisés de façon à obtenir les séries I, II, III, IV du tableau II où sont réunis les résultats de l'hémagglutination.

TABLEAU II. — Inhibition de l'hémagglutination par la conalbumine.

Antigènes	dilutions : 1mg/ ml ; 10 <sup>-1</sup> ; 10 <sup>-2</sup> ; 10 <sup>-3</sup> ; 10 <sup>-4</sup> ; 10 <sup>-5</sup> ; 10 <sup>-6</sup>						Témoins
	ml	ml	ml	ml	ml	ml	
volumes, ml	: 0,25	: 0,25	: 0,25	: 0,25	: 0,25	: 0,25	- - - - -
Sérum au 1/5.000, ml	: 0,25	: 0,25	: 0,25	: 0,25	: 0,25	: 0,25	- 0,25 ; 0,25
Subtosan, ml	: -	: -	: -	: -	: -	: -	: 0,25 ; 0,50 ; 0,25 ; -
G.R. sensibilisés, ml	: 0,05	: 0,05	: 0,05	: 0,05	: 0,05	: 0,05	- - -
G.R. normaux, ml	: -	: -	: -	: -	: -	: -	- 0,05 ; 0,05
	:	:	:	:	:	:	
<u>Résultats de l'hémagglutination</u>							
Série I : Conalbumine et G.R. sensibilisés par Conalbumine	:	:	:	:	:	:	
	-	-	-	-	-	-	- - - - -
	+	+	+	+	+	+	
Série III : Ovalbumine et G.R. sensibilisés par conalbumine	:	:	:	:	:	:	
	-	-	-	-	-	-	- - - - -
	+	+	+	+	+	+	
Série III : Conalbumine et G.R. sensibilisés par ovalbumine	:	:	:	:	:	:	
	-	-	-	-	-	-	- - - - -
	+	+	+	+	+	+	
Série IV : Ovalbumine et G.R. sensibilisés par ovalbumine	:	:	:	:	:	:	
	-	-	-	-	-	-	- - - - -
	+	+	+	+	+	+	

Ces résultats démontrent clairement que dans la réaction d'hémagglutination passive l'ovalbumine n'agit que par son impureté, la conalbumine, et que seul le système conalbumine-anticorps anti-conalbumine est actif puisque : 1° on obtient la même inhibition avec la même quantité d'antigène vis-à-vis des G. R. sensibilisés aussi bien avec la conalbumine qu'avec l'ovalbumine ; 2° pour obtenir une inhibition équivalente, il faut ajouter environ dix fois plus d'ovalbumine que de conalbumine en présence de G. R. sensibilisés aussi bien par l'ovalbumine que par la conalbumine.

3° CONCENTRATION-LIMITE D'ANTICORPS PRÉCIPITANTS DÉCELABLES PAR LA RÉACTION D'HÉMAGGLUTINATION PASSIVE. — Dans le but d'évaluer la concentration-limite d'anticorps nécessaire pour donner une réaction d'hémagglutination positive, nous avons comparé le taux d'hémagglutination et la concentration en anticorps, mesurée par l'azote spécifiquement précipité, pour différents sérum. Si nous considérons le sérum de lapin anti-conalbumine n° 1 et le sérum de cheval anti-sérumalbume humaine S-31-III (tableau III), nous voyons que 0,006 µg d'anti-

corps par millilitre de sérum sont encore suffisants pour donner une réaction d'hémagglutination positive, concentration nettement inférieure aux concentrations décelables par les techniques immunochimiques habituelles.

TABLEAU III. — Taux d'hémagglutination et teneur en anticorps de divers sérums.

Sérums		: µg Antigène :	: µg Anticorps :	Taux d'hémag-	Concentration
Description	n°	par ml de : sérum (équivalence)	par ml de : sérum	:glutination (inverse de : la dilution)	:Anticorps/ Taux d'hémag-
Lapins anti-Conalbumine	1	196	1.225	200.000	0,006
	2	131	816	3.000	0,272
	3	84	525	4.000	0,131
	6 + 8	88	550	4.000	0,137
Lapins anti- Albumine Humaine	1	116	725	900	0,805
	2	1.136	7.100	200.000	0,055
Chèvre anti-Alb.H.	1	276	1.725	8.000	0,216
Cheval anti- Albumine Humaine	S-31- III	2.788	17.437	3.000.000	0,006
	S-31- II	1.400	8.750	200.000	0,044
Chien anti- Conalbumine		non précipitant		1.000	

Contrairement aux résultats obtenus par Ovary et Briot [6], qui mesurent, par libération locale d'histamine, la quantité d'anticorps précipitables par l'antigène, nous obtenons des résultats qui varient considérablement d'un sérum à l'autre, ce qui semble indiquer que dans la réaction d'hémagglutination passive les anticorps précipitants ne sont pas les seuls en cause et que les anticorps dits bloquants ou monovalents sont également actifs. Ceci n'a rien de surprenant puisque nous avons pu démontrer (V. plus loin) avec le sérum de cheval S-31-III que des complexes solubles, obtenus dans la zone d'excès d'antigène, sont encore fortement hémagglutinants.

Malheureusement, nous n'avons pu, faute de matériel, rechercher les anticorps non précipitants dans le sérum de lapin anti-conalbumine n° 1 qui, vraisemblablement, en était exceptionnellement riche. Toutefois, nous avons constaté, en étudiant les liquides surnageants de la précipitation spécifique des sérums de lapin anti-conalbumine n° 2, 3, 6 et 8, que le taux d'hémagglutination tombe brusquement au point correspondant

au maximum de précipitation et la réaction reste négative dans toute la zone d'excès d'antigène.

Un sérum de chien qui ne donnait pas de précipitation visible a présenté un titre au millième à l'hémagglutination (tableau III). Si 0,006 µg d'anticorps par millilitre correspond à la limite de sensibilité de l'hémagglutination, ce sérum devrait contenir environ 6 µg d'anticorps par millilitre, teneur voisine de la sensibilité de la réaction de précipitation. L'absence de précipitation visible peut donc être attribuée, dans ce cas, soit à une concentration trop faible en anticorps, soit à la présence d'anticorps non précipitants.

**4° EVALUATION PONDÉRALE DU NOMBRE DE MOLÉCULES D'ANTICORPS NÉCESSAIRE POUR PROVOQUER L'AGGLUTINATION D'UN SEUL GLOBULE ROUGE.** — Si on admet que l'azote des anticorps du précipité spécifique correspond à la totalité des anticorps participant à la réaction d'hémagglutination (concentration-limite = 0,006 µg par millilitre pour le sérum de lapin anti-conalbumine n° 1) on peut, d'après le nombre des G. R. introduits dans le dernier tube positif ( $33,7 \times 10^6$ ), évaluer le nombre de molécules d'anticorps nécessaire pour provoquer l'agglutination d'un seul globule rouge. En prenant pour poids moléculaire des anticorps 180 000, et en admettant que tous les G. R. du dernier tube franchement positif sont agglutinés, on calcule que 50 molécules d'anticorps sont, en moyenne, fixées sur chaque globule rouge agglutiné. Il faut, toutefois, souligner que malheureusement ces calculs sont approximatifs et n'ont qu'une valeur très limitée puisque, d'un sérum à l'autre, pour une même espèce animale et avec le même antigène, la concentration-limite d'anticorps varie considérablement.

Il est cependant intéressant de rappeler que Pressman, Campbell et Pauling [7] sont arrivés, par extrapolation des résultats obtenus par dosage de l'acide arsénique, à évaluer à moins de 60 le nombre de groupements arséniques fixés sur chaque G. R. susceptible d'être agglutiné par l'antisérum correspondant. De même Mayer, Croft et Gray [8], travaillant en présence d'excès de complément, ont évalué à 48 le nombre de molécules d'anticorps anti-globule rouge de mouton nécessaire pour provoquer la lyse d'un globule rouge. Ce nombre, en parfait accord avec les travaux plus anciens de Brunius [9], est beaucoup plus faible que celui proposé par Heidelberger, Weil et Treffers [10].

**5° ACTIVITÉ DES COMPLEXES SOLUBLES DANS LA RÉACTION D'HÉMAGGLUTINATION PASSIVE.** — Il nous paraissait intéressant d'étudier, avec la réaction d'hémagglutination passive, un sérum de cheval (S-31-III) anti-sérumalbumine humaine donnant une courbe de précipitation sur laquelle apparaît un palier s'étendant de

5 mg à plus de 7,5 mg d'albumine par millilitre de serum [12]. Nous étions curieux de voir comment se comporterait la réaction d'hémagglutination dans cette zone où la quantité d'azote précipité reste à peu près constante, par formation, semble-t-il, de complexes solubles, bien que la quantité d'antigène ajouté varie et où le rapport N des anticorps/N de l'antigène ajouté passe de 3 à 1,5.

TABLEAU IV. — Résultats de l'hémagglutination passive obtenus avec des globules rouges sensibilisés par des quantités décroissantes de serum-albumine humaine.

Sérum	Dilutions						Témoin	mg Alb/ml G.R. à 2,5%
	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$		
Sérum initial S-31-III	-	-	-	-	-	-	-	-
	+	+	+	+	+	-	-	2,5
	+	+	+	+	-	-	-	0,25
	-	-	-	-	-	-	-	0,025
	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-
Surnageant de 5mg Alb/ml S. (Surnageant 1)	-	-	-	-	-	-	-	2,5
	+	+	+	+	-	-	-	0,25
	-	-	-	-	-	-	-	0,025
	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-
Surnageant de 7,5mg Alb/ml S. (Surnageant 2)	-	-	-	-	-	-	-	2,5
	+	+	+	+	-	-	-	0,25
	-	-	-	-	-	-	-	0,025
	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-

Après avoir préparé les surnageants correspondants aux points : 5 mg d'albumine par millilitre de serum (surnag. 1) et 7,5 mg par millilitre (surnag. 2), précipitations effectuées avec du serum dilué au 1/10 vu l'abondance du précipité formé, nous avons fait quelques essais pour déterminer la quantité optimum d'antigène nécessaire pour sensibiliser les G. R. tannés et préciser les taux d'hémagglutination de ces préparations. Les résultats obtenus sont résumés dans les tableaux IV et V où l'on voit : 1° que la quantité optimum d'albumine se situe vers 250 µg par millilitre de G. R. à 2,5 p. 100, et 2° que les liquides surnageants obtenus après précipitation par 5 et 7,5 mg d'albumine ont encore une très grande activité dans la réaction d'hémagglutination, bien que considérablement inférieure à celle du sérum initial.

Pour expliquer les taux élevés d'hémagglutination des surnageants 1 et 2, nous avons pensé que les G. R. pouvaient fixer une impureté éventuelle de l'albumine pourtant électrophorétiquement homogène, mais avec laquelle on peut toutefois observer quatre

TABLEAU V. — Taux d'hémagglutination obtenus avec des globules rouges sensibilisés par 250 µg d'albumine par millilitre de globules rouges à 2,5 p. 100.

	DILUTION POSITIVE	DILUTION NÉGATIVE
Sérum initial S-31-III . . . . .	1/3 000 000	1/4 000 000
Surnageant 1 . . . . .	1/100 000	1/200 000
Surnageant 2 . . . . .	1/100 000	1/200 000

traits fins supplémentaires par la technique d'Ouchterlony (4).

Dans cette hypothèse, l'affinité des G. R. pour l'impureté devait être très grande pour qu'une quantité aussi faible puisse sensibiliser les G. R. (moins de 2 p. 100 de 250 µg par millilitre de G. R. à 2,5 p. 100) et nous espérions qu'en traitant une même solution d'antigène par plusieurs lots de G. R. on pourrait éliminer, avec le premier lot, l'impureté responsable de l'activité des surnageants et observer une chute brutale de l'activité des surnageants vis-à-vis du deuxième lot de G. R. Après avoir préparé les surnageants correspondants aux points 5, 7,5, 8,5 et 9,5 mg d'albumine par millilitre de sérum (surnag. 1, 2, 3 et 4), nous avons ajouté à chacun de ces surnageants et au sérum initial (S-31-III) des G. R. sensibilisés de la façon suivante :

- a) G. R. sensibilisés par 500 µg d'albumine par millilitre de G. R. à 2,5 p. 100 (concentration double de la concentration optimum) ;
- b) G. R. sensibilisés avec le surnageant de a ;
- c) G. R. sensibilisés avec le surnageant de b ;
- d) G. R. sensibilisés avec le surnageant de c.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau VI ; on constate que les G. R. des séries b sont encore fortement agglutinés par des dilutions élevées (positifs à 1/10 000) de tous les surnageants. Ce résultat ne peut s'expliquer, en admettant l'activité d'une impureté de l'antigène, qu'en supposant que les constituants de l'antigène se fixent sans aucune sélectivité sur les G. R., mais dans des proportions reflétant leurs concentrations relatives dans la solution surnageante.

On constate, de plus, qu'avec des G. R. sensibilisés par de faibles quantités d'antigène (séries b, c, d), on obtient des phénomènes de zone très marqués (tableau VI).

a) *Essais de sensibilisation mixte des globules rouges.* — L'hypothèse d'une sensibilisation des globules rouges par une impureté de l'albumine n'étant donc pas exclue, nous avons voulu étudier les possibilités d'une sensibilisation mixte par deux antigènes que l'on sait se fixer facilement : la conalbumine d'une part et l'albumine humaine d'autre part.

Connaissant les concentrations optimum de ces deux antigènes,

(4) Observations faites par M. Burtin.

TABLEAU VI. — Hémagglutination par les surnageants.

Dilutions des sérum	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
S-31-III initial	-	-	-	-	-	-
G.R. série "a"	-	-	-	-	-	-
" " "b"	-	-	-	-	-	-
" " "c"	-	-	-	-	-	-
" " "d"	-	-	-	-	-	-
Surnageant 1	-	-	-	-	-	-
" " "a"	-	-	-	-	-	-
" " "b"	-	-	-	-	-	-
" " "c"	-	-	-	-	-	-
" " "d"	-	-	-	-	-	-
Surnageant 2	-	-	-	-	-	-
" " "a"	-	-	-	-	-	-
" " "b"	-	-	-	-	-	-
" " "c"	-	-	-	-	-	-
" " "d"	-	-	-	-	-	-
Surnageant 3	-	-	-	-	-	-
" " "a"	-	-	-	-	-	-
" " "b"	-	-	-	-	-	-
" " "c"	-	-	-	-	-	-
" " "d"	-	-	-	-	-	-
Surnageant 4	-	-	-	-	-	-
" " "a"	-	-	-	-	-	-
" " "b"	-	-	-	-	-	-
" " "c"	-	-	-	-	-	-
" " "d"	-	-	-	-	-	-

90 µg de conalbumine et 250 µg de sérumalbumine par millilitre de G. R. à 2,5 p. 100, nous avons préparé les lots suivants :

- G. R. sensibilisés par 90 µg de conalbumine ;
- G. R. sensibilisés par 250 µg d'albumine ;
- G. R. sensibilisés par un mélange de 250 µg d'albumine + 90 µg de conalbumine ;
- G. R. sensibilisés d'abord par 250 µg d'albumine, puis par 90 µg de conalbumine ;
- G. R. sensibilisés d'abord par 90 µg de conalbumine, puis par 250 µg d'albumine.

Le tableau VII résume les résultats obtenus avec un sérum de lapin anti-conalbumine, d'une part, et un sérum de cheval (S-31-III) anti-albumine humaine, d'autre part. Ces résultats suggèrent les conclusions suivantes :

1° La réaction d'hémagglutination passive est spécifique.

TABLEAU VII. — Sensibilisation mixte des globules rouges.

sérum	dilutions	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>
		ml	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Subtosan, ml									0,5
G.R. sensibilisés, ml		0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	
G.R. normaux, ml									0,05
G.R. série "a"		+	+	+	+	-	-	-	-
Sérum	"a"	-	-	-	-	-	-	-	-
Lapin	"a"	-	-	-	-	-	-	-	-
anti-conalbumine	"a"	-	-	-	-	-	-	-	-
mine	"a"	-	-	-	-	-	-	-	-
G.R. série "b"		+	+	+	+	-	-	-	-
Sérum	"b"	-	-	-	-	-	-	-	-
Cheval	"b"	-	-	-	-	-	-	-	-
anti-sérumal	"b"	-	-	-	-	-	-	-	-
bumine	"b"	-	-	-	-	-	-	-	-
G.R. série "c"		+	+	+	+	-	-	-	-
Sérum	"c"	-	-	-	-	-	-	-	-
Cheval	"c"	-	-	-	-	-	-	-	-
anti-sérumal	"c"	-	-	-	-	-	-	-	-
bumine	"c"	-	-	-	-	-	-	-	-
G.R. série "d"		+	+	+	+	-	-	-	-
Sérum	"d"	-	-	-	-	-	-	-	-
Cheval	"d"	-	-	-	-	-	-	-	-
anti-sérumal	"d"	-	-	-	-	-	-	-	-
bumine	"d"	-	-	-	-	-	-	-	-
G.R. série "e"		+	+	+	+	-	-	-	-
Sérum	"e"	-	-	-	-	-	-	-	-
Cheval	"e"	-	-	-	-	-	-	-	-
anti-sérumal	"e"	-	-	-	-	-	-	-	-
bumine	"e"	-	-	-	-	-	-	-	-

2° Dans un mélange de conalbumine et d'albumine humaine, où chacun des antigènes est à la concentration optimum, les G. R. ne fixent que l'albumine, probablement parce que les groupements récepteurs, qui semblent les mêmes dans les deux cas, sont saturés par l'antigène le plus concentré (environ 3 à 1).

3° Par contre, si l'on traite successivement les G. R. par ces deux antigènes, quel que soit l'ordre dans lequel on procède, on les sensibilise envers les deux antigènes comme si le deuxième antigène, quel qu'il soit, pouvait déplacer partiellement le premier déjà fixé.

Pour vérifier l'importance du facteur concentration dans la fixation de chacun de ces deux antigènes sur les G. R., nous avons traité successivement chacun des mélanges suivants par quatre lots de G. R.

## LOTS DE GLOBULES ROUGES

A <sub>1</sub> , A <sub>2</sub> , A <sub>3</sub> , A <sub>4</sub> . . . . .	250 µg d'albumine + 90 µg de conalbumine par ml. G.R. à 2,5 p. 100.
B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , B <sub>3</sub> , B <sub>4</sub> . . . . .	250 µg d'albumine + 250 µg de conalbumine par ml. G.R. à 2,5 p. 100.
C <sub>1</sub> , C <sub>2</sub> , C <sub>3</sub> , C <sub>4</sub> . . . . .	90 µg d'albumine + 90 µg de conalbumine par ml. G.R. à 2,5 p. 100.
D <sub>1</sub> , D <sub>2</sub> , D <sub>3</sub> , D <sub>4</sub> . . . . .	90 µg d'albumine + 250 µg de conalbumine par ml. G.R. à 2,5 p. 100.

## MÉLANGES D'ANTIGÈNES

Le cas échéant où l'un des antigènes aurait une affinité plus grande pour les G. R., nous devrions, avec l'un ou l'autre de ces mélanges, observer un changement de spécificité des différents lots de G. R. sensibilisés.

Les résultats obtenus (tableau VIII) montrent : 1° qu'on peut

TABLEAU VIII.

Sérums, dilutions	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
": + C.R. lot A <sub>1</sub>	+	+	-	-	-	-
": " lots A <sub>2</sub> , A <sub>3</sub> , A <sub>4</sub>	-	-	-	-	-	-
": " lot B <sub>1</sub>	+	+	-	-	-	-
Sérum Lapin anti- Conalbumine	" lots B <sub>2</sub> , B <sub>3</sub> , B <sub>4</sub>	-	-	-	-	-
": " lot C <sub>1</sub>	+	±	-	-	-	-
": " lots C <sub>2</sub> , C <sub>3</sub> , C <sub>4</sub>	-	-	-	-	-	-
": " lot D <sub>1</sub>	+	+	-	-	-	-
": " lot D <sub>2</sub>	±	-	-	-	-	-
": " lots D <sub>3</sub> , D <sub>4</sub>	-	-	-	-	-	-
": " lot A <sub>1</sub>	+	+	+	+	+	±
": " lots A <sub>2</sub> , A <sub>3</sub> , A <sub>4</sub>	-	-	-	-	±	-
": " lot B <sub>1</sub>	+	+	+	+	+	±
Sérum cheval anti- sérumalbumine	" lot B <sub>2</sub>	-	±	+	-	-
": " lots B <sub>3</sub> , B <sub>4</sub>	-	-	-	±	-	-
": " lot C <sub>1</sub>	-	-	-	+	-	-
": " lots C <sub>2</sub> , C <sub>3</sub> , C <sub>4</sub>	-	-	-	-	-	-
": " lot D <sub>1</sub>	-	-	±	±	-	-
": " lot D <sub>2</sub>	-	-	-	±	±	-
": " lots D <sub>3</sub> , D <sub>4</sub>	-	-	-	-	-	-

facilement obtenir une sensibilisation mixte des G. R. avec deux antigènes différents, à condition qu'ils soient à la même concentration dans le mélange (série B) ; 2° on n'observe pas de changement de spécificité en passant d'un lot de G. R. à l'autre pour un même mélange, ce qui confirme que chaque antigène a à peu près la même affinité pour les G. R. et que seule la concentration relative des deux antigènes dans le mélange détermine la spécificité des globules sensibilisés ; 3° le phénomène de zone très marqué avec le sérum de cheval est totalement absent avec le sérum de lapin.

b) *Essais d'inhibition de la réaction d'hémagglutination passive des surnageants par addition de diverses fractions de sérum humain.* — Les résultats précédents semblent exclure la possibilité d'une activité des surnageants vis-à-vis d'une impureté

de l'antigène. En effet, il semble impossible de sensibiliser les G. R. avec un antigène dans un mélange où celui-ci est en faible concentration par rapport à un autre susceptible de s'y fixer également. Toutefois, ces résultats ne peuvent être considérés comme définitifs car il reste toujours possible, bien que peu probable, que nous soyons en présence d'une impureté particulièrement avide de se fixer sur les G. R. Pour trancher la question nous avons essayé d'inhiber l'activité des surnageants en ajoutant à ces derniers des quantités appréciables de diverses fractions plus ou moins purifiées de sérum humain.

Au surnageant obtenu par précipitation du sérum S-31-III à raison de 8 mg d'albumine par millilitre de sérum, nous avons ajouté à raison de 1 mg/ml de sérum les fractions suivantes obtenues par précipitation à l'alcool (méthode de Cohn) :

IV-A. . . . .	Surnageant 31-IV-A.
II-C. . . . .	Surnageant 31-II-C.
IV-7-C. . . . .	Surnageant 31-IV-7-C.
Eau physiologique. . . . .	Surnageant 31-φ.

Après centrifugation, tous ces surnageants ayant conservé leur pouvoir d'hémagglutination vis-à-vis des G. R. sensibilisés par l'albumine humaine à la dilution 1/100 000, nous avons essayé de neutraliser leur activité en effectuant les combinaisons suivantes (tableau IX) :

TABLEAU IX.

SURNAGEANTS	FRACTIONS ajoutées 2 mg/ml sérum	HÉMAGGLUTINATION	
		Positive	Négative
S-31-IV-A. . . . .	IV-A	1/100 000	1/1 000 000
S-31-IV-A. . . . .	II-C	1/100 000	1/1 000 000
S-31-IV-7-C. . . . .	IV-7-C	1/100 000	1/1 000 000
S-31-II-C. . . . .	IV-A	1/100 000	1/1 000 000
S-31-II-C. . . . .	II-C	1/100 000	1/1 000 000
S-31-φ . . . . .	Eau physiologique	1/100 000	1/1 000 000

On voit que le taux d'hémagglutination n'a subi aucune modification, ce qui, croyons-nous, exclut la possibilité d'une réaction secondaire due à l'activité d'un anticorps anti-impureté de l'albumine utilisée pour sensibiliser les G. R. aussi bien que pour préparer l'anti-sérum. L'activité des surnageants ne pouvait alors s'expliquer qu'en admettant que les complexes solubles, formés dans la zone d'excès d'antigène, prenaient une part active dans l'hémagglutination passive, ce que nous avons d'ailleurs pu confirmer.

c) Pouvoir hémagglutinant des complexes solubles : sérum-albumine-anticorps de cheval. — A quatre tubes contenant chacun 1 ml de sérum S-31-III, on ajoute 3,5 ml d'eau physiologique et 0,5 ml d'une solution d'albumine humaine à 10 mg/ml (précipitation à 5 mg d'albumine par millilitre de sérum). Après avoir laissé la précipitation se parfaire pendant une nuit à la glacière, on centrifuge à froid et on lave soigneusement à trois reprises les précipités formés qu'on remet finalement en suspension dans 5 ml d'eau physiologique contenant :

N° 1 . . . . .	1,5 mg d'albumine.
N° 2 . . . . .	2,5 mg —
N° 3 . . . . .	3,5 mg —
N° 4 . . . . .	4,5 mg —
N° 5 . . . . .	5,5 mg —

soit les points correspondants à la précipitation à 6,5, 7,5, 8,5, 9,5 et 10,5 mg d'albumine par millilitre de sérum. On centrifuge le lendemain pour éliminer ce qui est resté des précipités et constate que dans le tube n° 5 la dissolution a été à peu près totale.

Une erreur dans la sensibilisation des G. R. ayant servi au titrage de ces surnageants nous a permis de constater que non seulement les complexes solubles provoquent l'agglutination des G. R. à de hautes dilutions mais encore que, fait assez étrange, pour obtenir une bonne hémagglutination il faut sensibiliser

TABLEAU X. — Activité des complexes solubles.

Dilutions des surnageants	: 10 <sup>-2</sup>	: 10 <sup>-3</sup>	: 10 <sup>-4</sup>	: 10 <sup>-5</sup>	: 10 <sup>-6</sup>	: 10 <sup>-7</sup>
Surnageant n°1	+	+	+	+	+	—
G.R. sensibili- lisés par 25 Oug d'albu- mine	n°2	+	+	—	—	—
n°3	+	+	+	—	—	—
n°4	—	—	—	—	—	—
n°1	+	+	+	±	—	—
n°2	+	+	+	+	—	—
G.R. sensibi- lisés par 2,5 ug d'albumine	n°3	+	+	+	+	—
n°4	+	+	+	+	+	—
n°5	+	+	+	+	+	—
n°2 + dil. égale de sér. norm. de cheval	—	—	—	—	—	—
Surnageant n°3 + dil. égale de sér. norm.	—	—	—	—	—	—
G.R. tannés, de cheval non sensibi- lisés	—	—	—	—	—	—
Surnageant n°4	—	—	—	—	—	—

préalablement les G. R. par une concentration en antigène dix fois plus élevée que dans le cas du sérum initial (tableau X). L'addition de sérums de cheval normal ne modifie en rien le taux d'hémagglutination des surnageants et ceux-ci sont sans activité vis-à-vis de G. R. tannés mais non sensibilisés.

L'analyse électrophorétique de la préparation n° 5 nous révèle la présence d'un complexe très homogène de mobilité intermédiaire entre les mobilités de l'antigène et des  $\gamma$ -globulines. Nous constatons également la présence d'un léger excès d'antigène (1,6 p. 100) provenant probablement de la dissociation partielle du complexe. L'homogénéité électrophorétique du complexe est tout à fait en accord avec les travaux de Singer et Campbell [41] qui ne constatent le déoublement du sommet des diagrammes électrophorétiques, révélant la présence des différents complexes formés, que pour des concentrations en antigène beaucoup plus élevées.

#### IV. — CONCLUSIONS.

Nous pouvons conclure de ce travail que la réaction d'hémagglutination passive d'érythrocytes tannés et sensibilisés par un antigène protéique est généralement très sensible et peut être avantageusement utilisée pour doser certains anticorps là où les techniques classiques s'avèrent insuffisantes.

Malheureusement son application est fatallement limitée par la spécificité de la fixation de l'antigène sur les globules rouges. Il semble que certains antigènes, comme l'ovalbumine, soient exclus sans raisons apparentes. Nous avons, en effet, démontré avec des sérums de lapin immunisés avec une solution d'ovalbumine contenant de la conalbumine que seuls les anticorps anti-conalbumine sont décelables par cette technique.

De même la facilité avec laquelle les globules rouges peuvent être sensibilisés simultanément par deux antigènes différents (conalbumine et sérumalbumine) nous oblige à être prudents dans l'interprétation des résultats obtenus avec des antigènes impurs.

Si on évalue, d'après les dosages de l'azote spécifiquement précipité, la quantité d'anticorps nécessaire pour donner une réaction d'hémagglutination positive, 50 molécules d'anticorps environ seraient déjà suffisantes pour qu'un G. R. soit agglutiné.

Nous avons toutefois constaté que le taux d'hémagglutination varie indépendamment de la concentration en anticorps décelables par précipitation spécifique, ce qui nous porte à croire que certains anticorps, dits bloquants ou incomplets, prennent part à la réaction d'hémagglutination au même titre que les anticorps précipitants. Nous avons, d'autre part, observé qu'avec le sérum

de cheval tout au moins, les complexes solubles obtenus dans la zone d'excès d'antigène sont fortement actifs (comme anticorps agglutinants) et cette activité persiste même pour des préparations contenant une faible concentration d'antigène libre.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] E. V. KEOGH, E. A. NORTH et M. F. WARBURTON. *Nature*, 1947, **160**, 63 ; 1948, **161**, 687.
- [2] G. MIDDLEBROOK et R. J. DUBOS. *J. exp. Med.*, 1948, **88**, 521.
- [3] S. V. BOYDEN. *J. exp. Med.*, 1951, **93**, 107.
- [4] M. HEIDELBERGER et F. KENDALL. *J. exp. Med.*, 1935, **62**, 697.
- [5] J. B. ALSEVER et R. B. AINSLIE. *N. Y. State J. Med.*, 1941, **41**, 126.
- [6] Z. OVARY et M. BRIOT. *Ces Annales*, 1951, **81**, 670.
- [7] D. PRESSMAN, H. CAMPBELL et L. PAULING. *J. Immunol.*, 1942, **44**, 101.
- [8] M. M. MAYER, C. C. CROFT et M. M. GRAY. *J. exp. Med.*, 1948, **88**, 427.
- [9] F. E. BRUNIUS. *Chemical Studies on the True Forssman Hapten, the corresponding Antibody, and their Interaction*. Aktiebolaget Fahlerantz, Boktryckeri, 1936.
- [10] M. HEIDELBERGER, A. J. WEIL et H. P. TREFFERS. *J. exp. Med.*, 1941, **73**, 695.
- [11] S. J. SINGER et D. H. CAMPBELL. *J. Am. Chem. Soc.*, 1952, **74**, 1794.
- [12] P. BURTIN et P. GRABAR. *Comptes rendus du II<sup>e</sup> Congrès de Biochimie*, Paris, 1952, 385.
- [13] P. GRABAR, A. BORDUAS et A. HOLTZER. *Acta Allergol.*, 1952, **5**, 30.

# EFFET DE LA CORTISONE SUR L'INFECTION EXPÉRIMENTALE DU COBAYE VACCINÉ AU BCG

par PIERRE R. BRYGOO (\*).

(Institut Pasteur. Laboratoires de la Tuberculose.)

## I. — HISTORIQUE.

On sait que la cortisone est capable de modifier considérablement la résistance aux infections tant naturelles qu'expérimentales, et nombreux sont les travaux qui ont tenté de préciser nos connaissances dans ce domaine.

Une place particulière a été faite au rôle de cette hormone dans l'évolution de la tuberculose depuis qu'on a montré qu'elle exerçait une action favorisante sur la tuberculose expérimentale du cobaye [44], du rat albinos [8, 9, 32], du lapin infecté par inhalation [31] et de la souris [10], même lorsque ce dernier animal avait été préparé par l'injection de bacilles morts antérieurement à l'inoculation [43].

Il faut remarquer cependant que l'unanimité n'est pas faite encore et que certains résultats expérimentaux se contredisent entre eux [24, 25], alors que d'autres confirment cette action stimulante chez le cobaye [6].

En clinique, depuis l'observation *princeps* de René Mach, on a rapporté de nombreux cas où un traitement à la cortisone avait coïncidé avec une tuberculose aiguë [12, 14, 22, 37, 42, 23, 19] et la question a été posée de savoir si on pouvait y reconnaître un lien de cause à effet [47, 48]. Certains auteurs, qui ne nient pas ou même confirment les données expérimentales précédentes, ne croient pas devoir les étendre à la clinique [20, 35, 5] et la question demeure controversée.

Quoi qu'il en soit, un problème connexe a été soulevé simultanément à propos de l'influence de la cortisone sur l'allergie tuberculinique.

On a montré que chez le lapin et le cobaye vaccinés au BCG, cette hormone pouvait faire disparaître la réaction cutanée et atténuer le choc général à la tuberculine [18, 30, 41] et

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 8 janvier 1953.

des résultats analogues sont rapportés chez le cobaye tuberculeux [2, 17, 28, 36], mais là aussi, d'autres auteurs font des réserves [1, 11].

En clinique, le débat reste ouvert entre ceux qui notent une disparition ou une atténuation des phénomènes allergiques [29, 26] et ceux qui soutiennent le point de vue contraire [13, 1] ou qui font état de résultats variables [3, 6].

Un troisième ordre de faits est à considérer : c'est *l'aspect immunologique lié aux anticorps sériques* que l'on peut mettre en évidence dans la tuberculose par les réactions de déviation du complément ou d'hémagglutination et d'hémolyse conditionnée. En général, la cortisone est tenue pour déprimer la formation des anticorps [16, 45, 33] et le taux des anticorps circulants comme l'ont montré une série de travaux de Fischel et coll. Mais, dans le cas particulier de la tuberculose, cette question a été très peu explorée. On sait seulement que chez le cobaye préparé avec des bacilles morts, l'ACTH ne semble pas avoir modifié le résultat des réactions de déviation du complément, bien que la réponse aux tests allergiques cutanés ait été déprimée [24] et, à notre connaissance, un seul travail [26] fait état chez des malades tuberculeux d'une augmentation du taux d'hémagglutination à la suite d'administration de cortisone, et cela n'est pas sans surprendre. Aucune donnée expérimentale portant sur ce point n'a encore été rapportée.

C'est en nous fondant sur ces trois points, volontairement soulignés dans l'historique, que nous avons abordé notre problème particulier. Nous avons voulu apprécier les effets de la cortisone sur la valeur de la prémunition due à la vaccination par le BCG chez le cobaye infecté expérimentalement. Pour ce faire, nous avons tenté d'analyser chez de tels animaux vaccinés les effets de la cortisone, précisément sur le cours de l'infection expérimentale, sur les manifestations cutanées de l'allergie tuberculinique, enfin sur les anticorps sériques mis en évidence par l'hémagglutination du type Middlebrook-Dubos. Nous souhaitions ensuite, en rapprochant ces différentes données, tenter d'expliquer le mécanisme d'une action éventuelle de la cortisone sur cette prémunition, et en tous cas, formuler quelques conclusions sur la confiance qu'il convient d'accorder aux effets du BCG dans l'hypothèse d'un traitement à la cortisone et d'un risque de surinfection.

## II. — TECHNIQUE.

Un groupe assez important de cobayes d'un poids moyen et en bon état, vaccinés au BCG par voie intradermique au 1/10 de milligramme, au moins 6 mois avant notre expérience et fortement allergiques, a été partagé en 4 lots.

*Le premier* a été inoculé avec une culture virulente d'une souche de bacilles tuberculeux humains (Brévannes) développée 6 jours en milieu de Dubos et diluée à  $\frac{10^{-3}}{2}$  mg par millilitre.

Chaque animal a reçu 1 ml. soit 1 500 de milligramme de corps bacillaires à l'état frais. Ce lot a été laissé en observation sans traitement.

*Le second lot* a été inoculé dans les mêmes conditions, mais après un traitement de 3 semaines à la cortisone, traitement qui n'a jamais été interrompu ensuite jusqu'à la fin de l'expérience.

*Le troisième lot* a été inoculé dans des conditions identiques, mais après un traitement de 15 jours seulement à la cortisone, interrompu définitivement une semaine avant l'inoculation.

*Le quatrième lot* a été traité à la cortisone, exactement comme le deuxième lot, mais sans avoir été inoculé de bacilles virulents.

Enfin, un *cinquième lot* (témoin) a été constitué d'animaux non vaccinés antérieurement, non allergiques et non traités à la cortisone pour juger de la virulence propre de la souche utilisée dans les conditions de l'expérience.

Nous avons employé une suspension d'acétate de cortisone (cortone Merck C° Inc. Rahway N. J.) à 25 mg par millilitre (1). Tous les animaux traités recevaient régulièrement une dose quotidienne aussi proche que possible de 5 mg par kilogramme, soit environ 1,5 mg par jour et par animal, administrée en injection intramusculaire dans les cuisses.

Les tests tuberculiniques cutanés étaient des intradermoréactions effectuées avec 1/10 de millilitre de la même préparation de tuberculine brute diluée au 1/10.

Les différents lots en observation ont été suivis très régulièrement ; tout animal venant à mourir a été examiné dans les mêmes conditions que ceux qui étaient volontairement sacrifiés. Les autopsies ont donné lieu à des prélèvements de ganglions, foie, rate et poumons, qui ont été examinés histologiquement par le médecin commandant Destombes, du Service de Santé Colonial (2). Les bacilles tuberculeux ont été recherchés dans tous ces organes à la fois sur les coupes et par culture sur milieu de Jensen de broyats rendus comparables entre eux par des dilutions appropriées.

Nous avons tenté de suivre, au cours de l'expérience, les taux d'anticorps sériques, mis en évidence par la réaction d'hémag-

(1) Ce produit nous a été aimablement procuré par les Services de l'Institut national d'Hygiène, auquel nous exprimons notre gratitude ainsi qu'à la personne de son directeur, M. le professeur L. Bugnard.

(2) En détachement à l'Institut Pasteur de Paris au moment où nous avons fait ce travail.

glutination de Middlebrook-Dubos et sa variante, la réaction d'hémolyse conditionnée, sur des prélèvements effectués par ponction cardiaque. Ces réactions sont dues à M. Boisvert.

### III. — RÉSULTATS.

a) L'ALLERGIE TUBERCULINIQUE CUTANÉE. — Les 4 premiers lots d'animaux ont été éprouvés par intradermo-réaction juste avant les premières injections de cortisone, puis une seconde fois avant l'inoculation et, après 15 jours de ce traitement, appliquée aux lots 2, 3, 4 (le lot n° 1 ne devant pas recevoir de traitement, ainsi qu'il a été indiqué plus haut).

Dans ce premier temps, on constate, à la mensuration, des réactions :

*Dans le premier lot.* — Sur 11 réactions :

Sont inchangées . . . . .	4
Sont majorées de 1 mm . . . . .	2
Sont diminuées de 1 mm. . . . .	5

*Dans le deuxième lot.* — Sur 13 réactions, 13 sont diminuées :

De 2 mm. . . . .	2
De 4 mm . . . . .	3
De 5 mm. . . . .	4
De 6 mm. . . . .	3
Devenue douteuse . . . . .	1

*Dans le troisième lot.* — Sur 13 réactions, 13 sont diminuées :

De 1 mm . . . . .	2
De 2 mm . . . . .	2
De 3 mm . . . . .	3
De 4 mm . . . . .	2
De 6 mm . . . . .	1
De 9 mm . . . . .	1
Devenues douteuses . . . . .	2

*Dans le quatrième lot.* — Sur 9 réactions, 9 sont diminuées :

De 2 mm . . . . .	2
De 3 mm . . . . .	2
De 4 mm . . . . .	5

Avant l'inoculation, il apparaît donc nettement que les lots 2, 3, 4 (qui ont reçu 15 jours de traitement à la cortisone), présentent une diminution de l'expression cutanée de l'allergie tuberculinique mesurée par le diamètre de la papule inflammatoire.

Puis, dans un second temps, après l'inoculation, nous pouvons considérer les mêmes lots, en comparant les résultats d'intradémo-réaction à ceux qu'on a obtenus immédiatement avant inoculation.

*Le lot n° 1*, qui a été inoculé avec des bactéries virulentes sans traitement, a présenté, chez deux animaux sacrifiés au 26<sup>e</sup> jour après cette inoculation, une diminution de 2 mm ; mais ensuite, aux 48<sup>e</sup>, 64<sup>e</sup> et 103<sup>e</sup> jours, c'est plutôt d'une augmentation du diamètre des intradermo-réactions qu'il s'agit, augmentation atteignant même jusqu'à 4 et 5 mm.

*Le lot n° 2* qui, depuis le début de l'expérience, a été traité constamment à la cortisone, présente deux résultats sans changement au 26<sup>e</sup> jour après l'inoculation chez des animaux qui avaient accusé une diminution nette du diamètre de leur réaction dans le premier temps. Mais au 48<sup>e</sup> jour après l'inoculation, un animal sacrifié avait une intradermo-réaction négative, les 3 derniers animaux sacrifiés au 61<sup>e</sup> jour et au 103<sup>e</sup> jour après l'inoculation avaient tous les 3 des réactions intradermiques douces et non mesurables.

*Le lot n° 3*, qui a reçu la cortisone seulement pendant 15 jours antérieurement à l'inoculation, a maintenu dans la période postérieure à l'inoculation des valeurs à peu près identiques à celles qui avaient été notées à la fin du traitement. Une réaction est exactement identique à elle-même au 26<sup>e</sup> jour après l'inoculation. D'autres, aux 26<sup>e</sup>, 48<sup>e</sup>, 60<sup>e</sup> jours, ont baissé de manière à peine sensible, la seule valeur qui semble avoir légèrement augmenté est du 103<sup>e</sup> jour après l'inoculation, soit près de 4 mois après la fin des injections de cortisone.

*Enfin, le lot n° 4*, qui a reçu de la cortisone durant toute l'expérience, mais qui n'a pas été inoculé de bactéries virulentes, présente des résultats en tous points comparables au deuxième lot, c'est-à-dire qu'au delà des 10 semaines à compter du début du traitement, toutes les intradermo-réactions pratiquées étaient interprétables comme négatives ou douteuses, en tous cas non mesurables.

On peut dégager de ceci les idées suivantes :

Aux doses que nous avons pratiquées, la cortisone est susceptible, en 15 jours, de diminuer d'une manière sensible le diamètre de la papule obtenue par intradermo-réaction tuberculinique chez des animaux allergisés au BCG.

Dans les mêmes conditions, la prolongation du traitement ne semble pas continuer à faire décroître régulièrement le diamètre des papules en dessous de la valeur ainsi acquise, mais néanmoins, au delà de la 10<sup>e</sup> semaine, les intradermo-réactions que nous avons pu pratiquer ont donné des résultats douteux et dont la valeur n'était plus chiffrable, certaines étant même totalement négatives.

L'inoculation de bactéries virulentes aux animaux allergiques ainsi traités, pratiquée dans le courant de la 3<sup>e</sup> semaine, ne modifie en rien le cours du phénomène, alors que chez des ani-

maux non traités on obtient plutôt une augmentation de l'intensité de la réaction cutanée.

De plus, les effets de la cortisone obtenus après une période de traitement de 15 jours apparaissent beaucoup plus durables qu'on ne serait en droit de le supposer, puisque chez des animaux inoculés avec des bacilles virulents une semaine après la fin du traitement et dont on vient de voir que les intradermoréactions auraient normalement tendance à la majoration, on note encore des valeurs abaissées au delà de 10 semaines après la fin du traitement.

Cependant, il y a lieu de remarquer, et ceci nous paraît important, qu'en fondant sur les modifications de l'érythème et du diamètre de la papule une appréciation de l'effet de la cortisone, c'est plutôt ses effets anti-inflammatoires que l'on peut apprécier que ses effets spécifiquement anti-allergiques. Ceci apparaît d'autant plus nettement que sur bien des réactions dont l'interprétation a été difficile ou qui n'étaient pas mesurables en diamètre, on vit apparaître secondairement, dans les délais normaux, une certaine nécrose avec escarre, ce qui indique bien que la tuberculine avait déclenché une réaction atypique, mais une réaction quand même. Nous avons fait quelques prélèvements de peau et il faut noter qu'entre des réponses positives et ces réactions atypiques, il n'y a guère, selon nous, que des différences quantitatives et non qualitatives. En particulier, la nécrose et les mobilisations cellulaires demeurent très comparables.

Il convient de rapprocher ces derniers faits de quelques travaux antérieurs. On a vu que les opinions ne s'accordent pas à propos des effets inhibiteurs de la cortisone sur les réactions allergiques. Il a déjà été signalé [39] que cette hormone est capable, dans le cas de l'injection cutanée de toxine diphtérique, d'atténuer davantage l'effet inflammatoire que l'effet nécrotique d'une telle injection. Une distinction analogue est introduite également à propos de l'ACTH [34].

L'action de la cortisone sur l'allergie tuberculinique chez le lapin sensibilisé à l'aide de bacilles morts [45] et sur la cornée du cobaye [46] a fait l'objet d'études histo-pathologiques dont les conclusions s'accordent mal entre elles, mais déjà l'hypothèse a été émise que cette action porterait sur les phénomènes inflammatoires tissulaires en général à la fois vasculaires et cellulaires, beaucoup plus que sur la sensibilité propre des cellules à la tuberculine [4, 28].

Il faut donc sans doute mettre l'accent sur une distinction qui s'impose entre l'allergie considérée spécifiquement sur le plan immunologique et ses effets tels que la réaction inflammatoire à l'occasion d'une épreuve cutanée à la tuberculine chez un animal sensible.

Selon nous, il résulte de l'examen de nos pièces que la cortisone conditionnerait plutôt qu'une véritable négativation de l'intradérmoréaction une sorte de « dissociation » des composantes normales d'une réponse positive. Sous l'effet de l'hormone, l'élément inflammatoire (érythème, papule) s'atténue ou disparaît alors que l'élément spécifique (mobilisation cellulaire et nécrose des cellules sensibles) est peu modifié.

Des données que nous rapportons, il serait alors abusif de conclure à une action dépressive de la cortisone sur l'allergie tuberculinique en général quand l'argument que nous aurions pour le faire peut être considéré comme un aspect assez banal de l'effet anti-inflammatoire bien connu de cette hormone. On remarquera, à ce propos, qu'une telle conclusion est en opposition avec celle que l'on déduirait de la mensuration du diamètre des réactions tuberculiniques cutanées et que cette méthode usuelle perd ici toute valeur pour apprécier l'état d'allergie.

*b) INFECTION EXPÉRIMENTALE.* — La cortisone étant considérée comme stimulant les infections tuberculeuses expérimentales, il reste à savoir si chez nos animaux vaccinés elle sera capable de modifier la résistance à la surinfection.

Il convient de faire état, d'emblée, des *résultats du 5<sup>e</sup> lot* composé d'animaux témoins inoculés uniquement avec la souche virulente aux mêmes doses et dans des conditions analogues aux autres.

Dès le 15<sup>e</sup> jour après l'inoculation, un animal de ce lot, mort d'infection intercurrente, a présenté des ganglions locaux et régionaux légèrement majorés, avec des plages épithélioïdes ; les cultures de ces ganglions, de la rate et du foie ont été positives bien que l'histologie de ces derniers organes n'ait pas révélé de lésions caractéristiques. Au 24<sup>e</sup> jour, deux autres animaux ont offert un tableau analogue.

Au 56<sup>e</sup> jour, les lésions demeurent localisées surtout au niveau des ganglions mais elles y sont très importantes ; l'un des animaux présente un abcès caséux musculaire au point d'inoculation, un autre une rate granuleuse. Les cultures de la rate et du foie sont positives.

Enfin les derniers survivants sacrifiés au 99<sup>e</sup> jour ont montré un ensemble de lésions évolutives généralisées surtout au niveau de la rate, du foie et des poumons, avec de gros tubercules caséux du volume d'un petit pois et une présence massive de bacilles dans tous les organes.

Ce lot prouve bien la virulence de la culture que nous avons inoculée.

*Les résultats du quatrième lot* doivent également être rapportés à part ; c'est le groupe d'autres témoins qui, ayant été vaccinés

au BCG, ont reçu de la cortisone durant toute l'expérience et n'ont pas été inoculés avec des bacilles virulents.

Ces animaux n'ont présenté aucune lésion tuberculeuse décelable macroscopiquement ou microscopiquement ; les cultures qui ont été pratiquées, organe par organe, n'ont pas permis d'isoler une seule colonie ayant les caractères du *Myc. tuberculosis* et aucun élément bacillaire n'a été trouvé à l'examen des coupes. On est donc en droit de conclure que la cortisone n'a aucunement conditionné la diffusion des bacilles BCG vivant dans l'organisme de ces animaux, ni déterminé une manifestation quelconque de virulence de ces germes.

On peut mettre en évidence sur ce lot la part de modifications histologiques qui revient à la cortisone elle-même.

Nous ne pouvons que vérifier ici ce qui a été rapporté par d'autres auteurs et en particulier la tendance à la stéatose hépatique [38, 27, 4, 21], à l'hyperplasie réticulaire de la rate avec une certaine atrophie des éléments lymphoïdes [3], caractères que nous retrouvons d'ailleurs chez les autres animaux qui ont reçu un traitement prolongé à la cortisone.

Signalons au passage également que lors des cultures d'organes qui furent pratiquées en assez grand nombre, à raison de 12 tubes de cultures par cobaye, nous avons constaté que la proportion globale était inégalement répartie entre les lots et que les organes d'animaux ayant reçu de la cortisone ont été ceux chez lesquels les souillures étaient les plus fréquentes, au moins dans la proportion significative du simple au double. Ces souillures étaient d'ailleurs composées de bactéries très diverses, que ces animaux soient morts spontanément ou aient été sacrifiés.

Des faits analogues ont déjà été signalés [25, 40, 7] qui illustrent ce caractère général de la cortisone de favoriser la prolifération de la flore bactérienne chez les animaux traités.

*Les résultats des premier, deuxième et troisième lots* sont les plus intéressants du point de vue qui nous concerne. Il s'agit des animaux vaccinés, réinoculés avec la souche virulente, les premiers n'étant pas traités, les seconds recevant de la cortisone durant toute l'expérience et les troisièmes en ayant seulement reçu 15 jours avant l'inoculation.

*Le lot n° 1* nous présente les effets de la vaccination BCG sur l'évolution de l'infection virulente expérimentale dont le lot n° 5 était le témoin.

Sur un ensemble de 11 animaux, les deux premiers sont morts spontanément au 14<sup>e</sup> jour après l'inoculation virulente et les neuf autres ont été sacrifiés aux 26<sup>e</sup>, 48<sup>e</sup>, 64<sup>e</sup> et 103<sup>e</sup> jours.

Les animaux morts au 14<sup>e</sup> jour de pneumopathie ne présentaient aucune lésion spécifique et les cultures pratiquées n'ont donné lieu à l'isolement d'aucune colonie de bacilles tuberculeux.

Au 26<sup>e</sup> jour, on note des plages épithélioïdes dans les ganglions loco-régionaux du point d'inoculation qui sont, en général, hypertrophiés et dont les cultures sont inégalement positives, certains d'entre eux étant cependant riches en bacilles cultivables. Les cultures des autres organes sont négatives, bien qu'à l'examen histologique on puisse discuter l'existence de très petits et très rares îlots épithélioïdes de la rate et du foie, sans bacilles colorables d'ailleurs.

Au 48<sup>e</sup> jour, il n'y a aucune lésion tuberculeuse visible ni aucun organe positif à la culture.

Au 64<sup>e</sup> jour, un animal sur deux est totalement négatif ; l'autre présente seulement des follicules ganglionnaires typiques avec bacilles visibles et cultivables.

Au 103<sup>e</sup> jour les trois derniers animaux sont sacrifiés.

A l'autopsie, sauf au niveau des ganglions inguinaux et abdominaux dont certains sont très augmentés de volume, aucune lésion macroscopique n'est décelable avec certitude, une rate est peut-être légèrement granuleuse. L'étude histologique confirme, pour les trois animaux, l'atteinte des ganglions lymphatiques allant de quelques îlots épithélioïdes à un remaniement total, mais sans caséification, les cultures ganglionnaires sont positives. Deux cobayes sur trois présentent de petites plages épithélioïdes de la rate dont l'un avec culture positive ; quelques bacilles sont isolables par culture du foie de ce même animal sans lésion organisée.

Il est donc évident, si on compare ce lot au lot n° 5, que le BCG a retardé considérablement l'évolution de l'infection expérimentale. La différence est particulièrement nette au 103<sup>e</sup> jour où les animaux non vaccinés sont envahis de gros tubercules et de foyers caséux, mais est sensible aussi, dès le début surtout, si on compare les résultats des cultures qui permettent l'isolement très fréquent de bacilles dans les organes des animaux non vaccinés, alors que chez les vaccinés, il n'y a qu'au niveau des ganglions que l'isolement est possible dans les conditions de notre travail et jusqu'au delà du 64<sup>e</sup> jour.

*Le lot n° 2, qui ne diffère du précédent que parce qu'il a reçu constamment de la cortisone, comportait 12 animaux. Six sont morts de pneumopathie aiguë, 1 au 22<sup>e</sup> jour, 2 au 34<sup>e</sup> jour, 2 au 39<sup>e</sup> jour, 1 au 48<sup>e</sup> jour, 2 au 61<sup>e</sup> jour et 1 au 103<sup>e</sup> jour, pour respecter le parallélisme avec le lot précédent.*

Au 22<sup>e</sup> jour, on trouve quelques plages épithélioïdes dans un ganglion lymphatique inguinal.

Au 26<sup>e</sup> jour, les ganglions loco-régionaux présentent une nette hypertrophie et des plages épithélioïdes, les cultures sont inégalement positives bien que certaines présentent des colonies innombrables. Les cultures des autres organes sont négatives et, ici

aussi, l'anatomo-pathologiste signale de discutables formations épithélioïdes, rarissimes et minuscules dans la rate.

Au 34<sup>e</sup> jour, à part une légère hypertrophie ganglionnaire, les animaux morts ne présentent rien de particulier. Les examens histologiques et les cultures sont négatifs.

Au 39<sup>e</sup> jour, même tableau ; les lésions ganglionnaires progressent et donnent lieu à un début de nécrose ; seules les cultures de ganglions sont positives et irrégulièrement.

Au 48<sup>e</sup> jour, les ganglions sont toujours seuls atteints et seuls à donner des cultures positives.

Au 61<sup>e</sup> jour, les deux animaux sacrifiés présentent seulement une atteinte ganglionnaire loco-régionale importante et assez riche en bacilles.

Au 103<sup>e</sup> jour enfin, les ganglions inguinaux et abdominaux sont très hypertrophiés, mais ce sont les seuls signes visibles à l'autopsie. L'histologie et la culture confirment la seule localisation ganglionnaire de l'infection expérimentale.

A quelques nuances près, telles qu'une plus forte mortalité en cours d'expérience et un certain amaigrissement, dont la comparaison avec le lot 4 prouve d'ailleurs qu'elles ne sont pas le fait propre de la cortisone, telles aussi qu'une fréquente stéatose hépatique qui, elle, est bien due à la cortisone, on ne peut qu'être frappé du parallélisme de l'infection expérimentale des lots 1 et 2.

*Le lot n° 3 était composé de 15 cobayes à l'origine. Durant la première partie de l'expérience, ces animaux ont reçu 15 jours seulement de traitement à la cortisone puis ont été inoculés après un repos de 8 jours. Six d'entre eux étant morts avant l'inoculation, il n'en restait que 9 pour la suite de notre étude. Deux sont morts aux 27<sup>e</sup> et 30<sup>e</sup> jours d'inoculation. Les autres ont été sacrifiés : 2 au 26<sup>e</sup> jour, 1 au 48<sup>e</sup> jour, 2 au 60<sup>e</sup> jour, 2 au 103<sup>e</sup> jour.*

Aux 26<sup>e</sup>, 27<sup>e</sup> et 30<sup>e</sup> jours, seule une légère réaction épithélioïde au niveau d'un ganglion inguinal a pu être décelée chez deux animaux, sans bacilles visibles et nos cultures sont restées négatives.

Aux 48<sup>e</sup> et 60<sup>e</sup> jours, les résultats ont été également négatifs.

Au 103<sup>e</sup> jour, seuls les ganglions étaient atteints nettement avec des nodules épithélioïdes typiques et des cultures présentant d'assez nombreuses colonies bacillaires.

On peut donc retenir que ce lot s'est comporté de façon analogue aux deux précédents.

c) ANTICORPS SÉRIQUES. — Nous avions choisi dans chaque lot un certain nombre de cobayes auxquels nous avons fait des prélèvements de sang au début de l'expérience, puis ensuite à des

périodes fixes. De plus, un prélèvement a été fait chez tous les animaux sacrifiés avant de les tuer.

Les réactions de Middlebrook-Dubos pratiquées sur ces 54 sérums, selon la technique classique et sa variante hémolytique, nous ont fourni des résultats dont nous ne donnerons pas le détail car leur confrontation est décevante et ne permet d'autres conclusions que les suivantes :

Dans l'ensemble, toutes les réactions ont été positives mais à des taux faibles aux environs de 1/16 à 1/32, sauf quelques exceptions, et ceci, sans qu'aucune différence valable ait pu être dégagée entre les différents lots ni, chez le même animal, qu'aucune variation importante soit survenue durant l'expérience. Nous devions d'ailleurs constater chez les témoins, avant l'inoculation, des résultats positifs à des taux analogues, ce qui prive ces examens de toute signification. Ceci a fait l'objet d'une vérification chez d'autres cobayes neufs, négatifs à l'intradermo-réaction tuberculinique et a été confirmé.

On peut donc au moins conclure que cette technique est dénuée d'intérêt chez le cobaye, et qu'aucun de ces résultats ne peut être retenu.

#### IV. — DISCUSSION. CONCLUSIONS.

En rapprochant les résultats de l'étude des intradermo-réactions de ceux fournis par l'inoculation expérimentale d'une souche virulente chez nos divers lots d'animaux, on peut dégager les idées suivantes.

Ainsi que d'autres auteurs l'ont signalé antérieurement, l'intradermo-réaction à la tuberculine, de positive et typique qu'elle était chez les animaux allergisés au BCG au début de l'expérience, a perdu, à la suite du traitement des animaux par la cortisone, un certain nombre des caractères sur lesquels est fondée normalement l'appréciation qualitative et quantitative d'une réponse positive. L'induration, la rougeur, l'œdème et le diamètre de la papule ainsi constituée sont d'expression essentiellement inflammatoire et tendent à disparaître sous l'effet anti-inflammatoire de la cortisone. Cependant la nécrose et les réactions cellulaires de la peau dues à la tuberculine demeurent analogues, en dépit du traitement hormonal, ce qui laisse supposer que le mécanisme intime de l'allergie cutanée n'est pas sensiblement modifié.

Cette idée se trouve confirmée par les résultats des épreuves de résistance à la surinfection virulente de ces animaux vaccinés. Alors que les lésions tuberculeuses des animaux témoins sont généralisées dans les conditions de notre expérience au bout de 100 jours environ, on peut aisément constater qu'il n'y a pas de différence réelle entre les trois lots d'animaux vaccinés et surinfectés selon qu'ils ont reçu ou non un traitement à la cortisone,

et que par conséquent la résistance à la surinfection conférée par la vaccination BCG n'est pas altérée par cette hormone.

Il est bon de noter au passage que la cortisone chez des animaux ayant reçu du BCG ne conditionne aucunement une reprise de virulence de ce germe chez l'animal.

Les effets du traitement à la cortisone sur les anticorps humoraux chez les animaux tuberculés n'ont malheureusement pas pu être appréciés et il nous manque ainsi un troisième élément de jugement qui, rapproché des deux autres, aurait eu un intérêt certain.

Néanmoins, il nous semble pouvoir conclure que chez le cobaye, la cortisone aux doses employées ne modifie pas sensiblement les effets de la vaccination, contrairement à ce que l'examen ordinaire des épreuves tuberculiniques cutanées pourrait conduire à imaginer.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] ET. BERNARD et B. KREIS. *Rev. Tub.*, 1951, **15**, 802.
- [2] R. G. BLOCH, K. VENNESLAND et C. GURNEY. *J. Lab. Clin. Med.*, 1951, **38**, 133-147.
- [3] P. BOURGEOIS et VIC DUPONT. *Bull. Mém. Soc. Méd. Hôp. Paris*, 1952, **68**, 895.
- [4] G. CLÉMENT. *Arch. Sci. Physiol.*, 1951, **5**, 169-195.
- [5] F. COSTE, P. BOURGEOIS, GALMICHE et VIC DUDONT. *Rev. Tub.*, 1951, **15**, 809-812.
- [6] F. COSTE, P. BOURGEOIS et coll. *Rev. Tub.*, 1951, **15**, 698-804 et *Bull. Mém. Soc. méd. Hôp. Paris*, 1952, **68**, 895.
- [7] F. COSTE, B. PIGUET, P. GALMICHE et J. CAYLA. *Ann. Méd.*, 1951, **52**, 747-802.
- [8] M. M. CUMMINGS et P. C. HUDGINS. *Am. Rev. Tub.*, 1952, **65**, 603-611.
- [9] M. M. CUMMINGS, P. C. HUDGINS, M. C. WHORTHON et W. H. SHILDON. *Am. Rev. Tub.*, 1952, **65**, 596-602.
- [10] D'ARCY HART et REES. *Lancet*, 1950, **2**, 391.
- [11] V. J. DERBES, J. H. DENT, N. K. WAEVER et D. D. VAUGHAN. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1950, **75**, 423.
- [12] A. R. DOERNER, et C. F. NAEGELE. *Am. Rev. Tub.*, 1951, **64**, 564-571.
- [13] E. E. FISCHEL. *Bull. New-York Acad. Med.*, 1950, **26**, 255.
- [14] L. FREED, M. H. LEVIN et J. B. RIVO. *J. Am. Med. Assoc.*, 1951, **147**, 242.
- [15] P. G. GELL et I. T. HINDE. *Brit. J. exp. Path.*, 1951, **32**, 516-529 et *Bull. Acad. Suisse Sci. Méd.*, 1952, **8**, 200-202.
- [16] F. G. GERMUTH et B. OTTINGER. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1950, **74**, 815.
- [17] HALPERN. *Soc. Fr. d'Allergie*, 20-2-1951.
- [18] S. HARRIS et T. N. HARRIS. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1950, **74**, 186.
- [19] HARRIS-JONES et N. K. PEIN. *Lancet*, 1952, **263**, 115.

- [20] P. HARVIER, F. COSTE, J. TURIAF, F. DELBARRE et Coll. *Bull. Mém. Soc. méd. Hôp.*, 1950, **60**, 1438.
- [21] D. V. INGIE, M. C. PRESTHUD, J. E. NEZAMIS. *Am. J. Physiol.*, 1951, **166**, 171-175.
- [22] E. Q. KING, J. B. JOHNSON, G. S. BATTEN. *J. Am. Med. Assoc.*, 1951, **147**, 238-241.
- [23] R. F. KLEINSCHMIDT et J. M. JOHNSTON. *Ann. Int. Méd.*, 1951, **35**, 694.
- [24] LE MAISTRE et THOMPSETT. *Am. Rev. Tub.*, 1951, **64**, 295-306.
- [25] LE MAISTRE et THOMPSETT. *J. Exp. Med.*, 1952, **95**, 393-407.
- [26] LE MAISTRE, THOMPSETT et MUSCHENHEIM. *J. Clin. Invest.*, 1951, **30**, 445-450.
- [27] R. K. LEVINKI FARBER. *Trans. New-York Acad. Sci.*, 1951, série 11, **18**, 260-262.
- [28] A. LICHTWITZ, S. de SÈZE, G. THIÉRY et Coll. *Sem. Hôp.*, 1951, **27**, 3337-3354.
- [29] J. B. LONG et C. B. FAVOUR. *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 1950, **87**, 186.
- [30] D. A. LONG et A. A. J. MILES. *Lancet*, 1950, **1**, 492.
- [31] M. B. LURIE, P. ZAPPASODI, A. M. DANNEBERG et I. B. SWARTZ. *Science*, 1951, **113**, 234-237.
- [32] J. M. MICHAEL, M. M. CUMMINGS, W. L. BLOOM. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1950, **75**, 613.
- [33] G. S. MIRICK. *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 1951, **88**, 332-351.
- [34] Ch. OSGOOD, C. B. FAVOUR. *J. Exp. Med.*, 1951, **94**, 415.
- [35] J. PARAF et J. DESBORDES. *Presse Médicale*, 1951, **59**, 206.
- [36] J. PARAF et J. DESBORDES. *Rev. Tub.*, 1951, **15**, 458.
- [37] C. G. POPS, P. OTTOSEN. *J. Am. Med. Assoc.*, 1951, **147**, 241-242.
- [38] A. R. RICH, T. H. COCHRAN, D. C. Mc GOON. *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 1951, **88**, 101-109.
- [39] RONUTTI. *Ann. Endocrinol.*, 1951, **12**, 481-492.
- [40] H. SELYE. *Canad. Med. Ass. J.*, 1951, **64**, 489-494.
- [41] W. H. SHILDON, M. M. CUMMINGS et L. D. EVANS. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1950, **75**, 616.
- [42] F. SIGUER, ZARA, J. J. WELTI et Coll. *Bull. Mém. Soc. Méd. Hôp. Paris*, 1951, **67**, 931.
- [43] M. SOLOTOROWSKI, F. GRÉGORY et H. STÖERK. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1951, **76**, 286.
- [44] SPAIN et MOLOMUT. *Am. Rev. Tub.*, 1950, **62**, 337.
- [45] F. W. TILLOTSON. *Arch. Path.*, 1951, **52**, 119.
- [46] I. UELINGER et SIEBENMANN. *Bull. Acad. Suisse Sci. Med.*, 1952, **8**, 203-212.
- [47] Anonyme. *Presse Médicale*, 1951, **59**, 1519.
- [48] Anonyme. *N. England. J. Med.*, 1951, **245**, 662.

**ISOLEMENT PAR SÉLECTION  
DE MUTANTS D'ESCHERICHIA COLI  
SYNTHÉTISANT SPONTANÉMENT L'AMYLOMALTASE  
ET LA  $\beta$ -GALACTOSIDASE (\*)**

par GERMAINE COHEN-BAZIRE et MADELEINE JOLIT.

(Institut Pasteur, Service de Physiologie microbienne.)

**INTRODUCTION.**

L'utilisation métabolique des disaccharides lactose et maltose par *E. coli* se fait par l'intermédiaire de la  $\beta$ -galactosidase [1, 2] et de l'amyloomaltase [3, 4, 5] respectivement. Chez les bactéries « normales » ces enzymes ne sont synthétisés que lorsqu'un inducisseur spécifique,  $\beta$ -galactoside [6] où maltose respectivement, est présent dans le milieu de culture.

Il est possible cependant d'isoler, à partir de ces souches « normales », des souches ayant la propriété de synthétiser spontanément, (c'est-à-dire en l'absence d'inducteur spécifique exogène) soit la  $\beta$ -galactosidase, soit l'amyloomaltase. Nous avons obtenu ce résultat grâce à une méthode spéciale de sélection, dont nous exposons ici le principe et les résultats. J. Lederberg [7] avait, avant nous et par une autre technique, obtenu un mutant d'*E. coli* synthétisant spontanément la  $\beta$ -galactosidase.

**MATÉRIEL ET TECHNIQUES.**

**SOUCHE.** — Clone ML 30 de la souche ML d'*E. coli*. Ce mutant est de phénotype M+L+Gal+ [8] (Maltose+, Lactose+, Galactose+).

Rappelons que le signe + ou - signifie l'utilisation ou la non utilisation métabolique du substrat en question par la souche considérée.

**MILIEU DE CULTURE.** — Milieu minéral « 56 » contenant : PO<sub>4</sub>KH<sub>2</sub>, 13,6 g ; SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 2 g ; SO<sub>4</sub>Mg 7 H<sub>2</sub>O, 0,2 g ; Cl<sub>2</sub>Ca,

(\*) Travail effectué avec l'aide d'une subvention du *National Cancer Institute of the National Institutes of Health* des Etats-Unis d'Amérique.

0,01 g ;  $\text{SO}_4\text{Fe 7 H}_2\text{O}$ , 0,0005 g ; KOH, q. s. p. pH 7,4 ;  $\text{H}_2\text{O}$ , q. s. p. 1 000 ml.

Produits utilisés : les sels sont des produits Prolabo RP ; glucose RAL ; maltose Pfanstiehl C. P. recristallisé deux fois à partir d'alcool à 80° ; lactose Pfanstiehl (C. P.). Les solutions de sucre dans l'eau bidistillée sont stérilisées par filtration. L'*o*-nitrophényl- $\beta$ -D-galactoside a été synthétisé au laboratoire [9].

#### DÉTERMINATION DES ACTIVITÉS ENZYMATIQUES.

Le dosage de la  $\beta$ -galactosidase est effectué sur des suspensions de bactéries traitées par le toluène pendant vingt minutes à 37° C. L'hydrolyse enzymatique de l'*o*-nitrophényl- $\beta$ -D-galactoside M/375 (ONPG) est mesurée à 28° en présence de ClNa M/10 au spectrophotomètre de Beckman à 420 m $\mu$  [6]. L'activité est exprimée en m $\mu$  M d'*o*-nitrophénol (ONP) libéré par minute, par milligramme d'N bactérien. L'unité d'activité représente l'hydrolyse d'1 m $\mu$  M d'ONPG par minute par milligramme d'N bactérien. L'activité de l'amylomaltase [5] est mesurée par dosage manométrique de l'oxygène consommé en présence de notatine par les suspensions de bactéries toluénisées et exprimée en  $\mu\text{M}$  d' $\text{O}_2$  par heure par milligramme N bactérien. (Unité = 1  $\mu\text{M}$   $\text{O}_2 \times h^{-1} \times mg N^{-1}$ .) L'activité enzymatique « constitutive » est mesurée sur des suspensions de bactéries ayant subi deux cultures successives en glucose. Ces deux cultures correspondent à 12 générations bactériennes ; l'enzyme induit par le lactose ou le maltose n'étant plus synthétisé en l'absence d'inducteur exogène se trouve ainsi dilué quatre mille fois.

#### EXPÉRIENCES.

LA SÉLECTION DES MUTANTS A ENZYME CONSTITUTIF. — Pour la commodité de l'exposé, nous désignerons par les symboles suivants les divers types de bactéries dont il va être question :

$L^i$  : bactéries à  $\beta$ -galactosidase (lactase) induite (forme normale).

$L^c$  : bactéries à  $\beta$ -galactosidase constitutive, synthétisée spontanément en l'absence d'inducteur exogène.

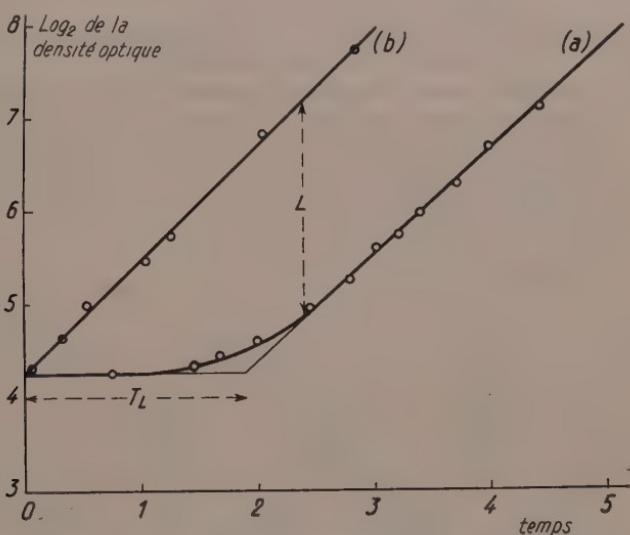
$M^i$  : bactéries à amylomaltase induite.

$M^c$  : bactéries à amylomaltase constitutive.

Une culture de bactéries  $L^i$  ensemencée en milieu synthétique liquide avec du glucose comme seul aliment carboné se multiplie immédiatement d'une manière exponentielle, à condition que les bactéries proviennent d'une culture exponentielle ou ayant achevé sa croissance depuis peu de temps. En revanche, ces mêmes bactéries  $L^i$  ensemencées dans un milieu contenant du

lactose comme seule source de carbone ne se développeront qu'après une *période de latence* de deux heures environ (fig. 1, courbe *a*), à moins qu'elles ne proviennent d'une culture effectuée en présence d'un inducteur de la  $\beta$ -galactosidase, par exemple d'une culture en lactose (courbe *b*).

Si, dans la population bactérienne non adaptée au lactose, il existe un certain nombre de mutants  $L^c$  synthétisant *spontanément* la  $\beta$ -galactosidase, ces bactéries  $L^c$  se multiplieront dès le début de la culture en lactose (courbe *b*), c'est-à-dire deux heures



Croissance d'*E. coli* ML sur milieu synthétique « 56 » au lactose : *a*) bactéries  $L^c$  ensemencées à partir d'une culture en glucose.  $T$ , période de latence;  $L$ , latence de croissance. *b*) bactéries  $L^c$  ensemencées à partir d'une culture en lactose ou bactéries  $L^c$  provenant d'une culture en glucose.

avant les bactéries  $L^c$ ; la culture se trouvera donc enrichie en bactéries  $L^c$  dans une proportion déterminée par la « latence de croissance » ( $L$ ) [10]. Transférions cette culture « adaptée » sur un milieu contenant du glucose ; les bactéries  $L^c$  vont se multiplier désormais sans synthétiser la  $\beta$ -galactosidase, de sorte qu'après quelques générations, elles n'en posséderont pratiquement plus (voir Monod et Cohn, p. 83) [11]. Une période de latence leur sera de nouveau nécessaire pour croître en présence de lactose, période pendant laquelle le nombre relatif de bactéries  $L^c$  pourra encore augmenter.

Un certain nombre de repiquages sur lactose et glucose alternativement devrait donc, en principe, aboutir à la sélection de bactéries synthétisant spontanément la  $\beta$ -galactosidase, et la

même méthode serait applicable, *mutatis mutandis*, à l'isolement de bactéries M<sup>c</sup>, synthétisant spontanément l'amylomaltase. Tout ceci, bien entendu, à la condition que ces bactéries L<sup>c</sup> et M<sup>c</sup> existent (et en proportion suffisante) dans les souches normales ; à la condition également que les propriétés de ces mutants hypothétiques ne soient pas telles qu'ils soient fortement contre-sélectionnés pour d'autres causes (faible taux de croissance ou de survie, etc.).

Les résultats exprimés dans le tableau I montrent que dans les

TABLEAU I. — Sélection de bactéries synthétisant spontanément la  $\beta$ -galactosidase et l'amylomaltase.

Numéro de la culture (1)	SÉLECTION DE BACTÉRIES L <sup>c</sup>		SÉLECTION DE BACTÉRIES M <sup>c</sup>	
	Activité de la $\beta$ -galactosidase ( $\mu\text{M } \text{O}_2 \times \text{min}^{-1} \times \text{mgN}^{-1}$ )		Numéro de la culture	Activité de l'amylomaltase ( $\mu\text{M } \text{O}_2 \times h^{-1} \times \text{mgN}^{-1}$ )
	Expérience I	Expérience II		
	p. 100 de bact. L <sup>c</sup> dénombrées	p. 100 de bact. L <sup>c</sup> dénombrées		
A <sub>1</sub>	10	50	B <sub>2</sub>	0
A <sub>4</sub>	210	250	D <sub>2</sub>	0
A <sub>5</sub>	390	2 000	B <sub>6</sub>	49
A <sub>6</sub>	830	0,53	D <sub>6</sub>	4
C <sub>6</sub>	10		B <sub>8</sub>	47
A <sub>8</sub>	9 000	5 500	D <sub>8</sub>	1,3
C <sub>8</sub>	20		B <sub>10</sub>	62,5
A <sub>10</sub>	12 500			
C <sub>10</sub>	10		B <sub>13</sub>	45
A <sub>12</sub>	17 000		D <sub>13</sub>	0
C <sub>12</sub>	20			
A <sub>15</sub>	17 000	75		
C <sub>15</sub>	20			

(1) Le nombre en indice correspond au nombre de repiquages qu'a subis la culture en présence de lactose ou de maltose.

La souche ML 30 d'*E. coli* est ensensemée à raison de  $2 \cdot 10^7$  bactéries/ml dans 100 ml de milieu minéral glucosé à 4 %; cette culture (A<sub>1</sub>) est agitée à 37° C. Après seize heures de culture alors que la densité optique correspond à  $4 \cdot 10^9$  bactéries/ml, A<sub>1</sub> est repiquée à raison de  $2 \cdot 10^8$  bactéries/ml dans 100 ml de milieu contenant 4 % de lactose; cette culture (L<sub>1</sub>) est agitée à 37° pendant huit heures. L<sub>1</sub> est repiquée de nouveau à raison de  $2 \cdot 10^7$  bactéries/ml sur milieu glucosé, donnant (A<sub>2</sub>), cette culture à nouveau est repiquée sur milieu lactosé et ainsi de suite.

Une série de repiquages successifs en lactose sans culture intermédiaire en glucose est effectuée comme contrôle : (C<sub>1</sub>), (C<sub>2</sub>), (C<sub>3</sub>).

Le même procédé est appliqué pour la sélection de bactéries M<sup>c</sup> : repiquages successifs alternés en présence de maltose : (M<sub>1</sub>), (M<sub>2</sub>), (M<sub>3</sub>) et de glucose : (B<sub>1</sub>), (B<sub>2</sub>), (B<sub>3</sub>)... Une culture servant de contrôle est entretenue uniquement sur maltose : (D<sub>1</sub>), (D<sub>2</sub>), (D<sub>3</sub>).

cultures entretenues par repiquages alternés en lactose et glucose d'une part, en maltose et glucose d'autre part, il se produit un accroissement considérable de l'activité enzymatique constitutive. Au contraire, dans les cultures repiquées uniquement soit en lactose, soit en maltose, l'activité spontanée (mesurée après deux cultures successives en absence d'inducteur exogène) demeure nulle ou négligeable.

Après un certain nombre de repiquages alternés, l'activité spontanée cesse d'augmenter d'une manière significative ; nous avons alors procédé à un étalement sur gélose ordinaire des cultures A<sub>15</sub> et B<sub>13</sub>. L'activité  $\beta$ -galactosidasique de cultures *en glucose* obtenues à partir de trois colonies : a<sub>1</sub>, a<sub>2</sub>, a<sub>3</sub>, isolées de A<sub>15</sub> était a<sub>1</sub>, 25 000 unités ; a<sub>2</sub>, 15 000 unités ; a<sub>3</sub>, 50 unités. Notons qu'une culture en lactose de bactéries L<sup>c</sup> a une activité de 12 000 unités environ. Les mutants constitutifs synthétisent donc notablement plus d'enzyme que la forme normale inductible.

L'activité amyломaltasique de cultures *en lactose* obtenues à partir de quatre colonies b<sub>1</sub>, b<sub>2</sub>, b<sub>3</sub> et b<sub>4</sub> isolées de B<sub>13</sub> était : b<sub>1</sub>, 93 unités ; b<sub>2</sub>, 53 unités ; b<sub>3</sub>, 68 unités ; b<sub>4</sub>, 51 unités. L'activité d'une culture en maltose de bactéries M<sup>c</sup> est de l'ordre de 50 unités.

Nous avons pu, au cours de la sélection, effectuer la numération (*cf.* tableau I) des bactéries L<sup>c</sup> en employant le procédé suivant : sur une boîte de gélose ordinaire contenant une centaine de colonies de 2 à 3 mm de diamètre, on verse du toluène. Après dix minutes, le toluène est enlevé et la gélose est recouverte d'un papier filtre imprégné d'*o*-nitrophényl- $\beta$ -D-galactoside M/75. Les colonies L<sup>c</sup> produisent presque immédiatement une tache jaune très intense sur le papier, tandis que les colonies L<sup>i</sup> ne jaunissent que très lentement, sans jamais dessiner sur le papier une tache nette.

Nous avons vérifié ainsi que le nombre de bactéries L<sup>c</sup> augmente au cours de la sélection et correspond assez bien à l'activité spontanée de la culture exprimée en pourcentage de l'activité d'une souche L<sup>c</sup> pure.

Notons que cette méthode a été utilisée pour sélectionner des mutants « constitutifs » de deux souches d'*E. coli* K12 ; l'une des deux souches a dû être auparavant irradiée à l'U. V. afin d'augmenter le taux de mutations spontanées.

#### L'ACTIVITÉ « DE BASE » DANS LES CULTURES NORMALES.

Le dosage de la  $\beta$ -galactosidase est rendu très précis et sensible par l'emploi de l'*o*-nitrophényl- $\beta$ -D-galactoside comme substrat. La sensibilité de cette technique permet de déceler une trace d'activité  $\beta$ -galactosidasique même chez les souches normales

cultivées en l'absence d'inducteur. Cette activité est inférieure au 1/1 000 de l'activité des souches  $L^c$  et d'ailleurs assez variable suivant les clones. Une partie en est due sans doute à la présence d'impuretés  $\beta$ -galactosidiques dans les sucrez utilisés comme source de carbone : par exemple, une culture  $L^i$  en maltose Pfanstiehl possède une activité  $\beta$ -galactosidasique de 300 unités, alors que la même culture en maltose deux fois recristallisé n'a plus qu'une activité de l'ordre de 10 unités. Cependant, quel que soit le nombre de recristallisations, il demeure toujours une activité de base « irréductible ».

Les résultats qui précèdent suggèrent que cette activité de base irréductible n'est pas répartie uniformément dans toutes les bactéries  $L^i$ , mais concentrée dans un petit nombre d'individus mutants de type  $L^c$ . La présence de 1 à 5 bactéries  $L^c$  pour  $10^4$  bactéries  $L^i$  rendrait compte de cette activité.

Il existe, d'autre part, des souches lactose-négatives ( $L^-$ ) d'*E. coli* ML, chez lesquelles le lactose n'est pas utilisé et n'induit pas la formation de  $\beta$ -galactosidase, pas plus qu'il n'a accès à l'enzyme lui-même, lorsque celui-ci a été induit par d'autres galactosides (A. M. Torriani, voir Monod et Cohn [41]) : ces souches  $L^-$  possèdent, tout comme les  $L^+$ , une activité de base qui ne peut s'expliquer par les impuretés contenues dans le milieu. Nous avons supposé que, dans ce cas encore, l'activité de base était due à la présence de bactéries  $L^c$ . En utilisant le test décrit plus haut, qui permet de révéler les colonies  $L^c$ , nous avons décelé la présence de deux colonies de ce type parmi 20 000 colonies de la souche lactose négative ML3. Nous avons pu, de l'une de ces colonies, isoler et conserver une souche qui, effectivement, synthétise spontanément la  $\beta$ -galactosidase. Cette souche est donc de caractère  $L^-$  en ce qu'elle n'utilise pas le lactose comme aliment carboné, encore que son activité  $\beta$ -galactosidasique (mesurée dans des suspensions tolénisées) soit aussi élevée que celle des souches  $L^c$  lactose-positives ( $L^{+c}$ ). Le  $QO_2$  de ces bactéries  $L^{-c}$  en présence de lactose est pratiquement nul. La galactosidase, synthétisée constitutivement par cette souche, demeure donc « cryptique » *in vitro* à l'égard du lactose. Notons que les quatre phénotypes théoriquement possibles  $L^{+c}$ ,  $L^{+i}$ ,  $L^{-c}$ ,  $L^{-i}$  ont pu être isolés. (Voir tableau II.)

Ajoutons enfin que nous avons isolé à trois reprises différentes dans des populations de bactéries  $L^{+c}$  irradiées aux rayons U. V. des clones de type  $L^-$  irréversibles ( $L^-$  « *absolu* »), c'est-à-dire chez lesquels on ne rencontre jamais de mutants  $L^+$ . Or, chez ce  $L^-$  *absolu*, l'activité galactosidasique « de base » est nulle, alors qu'elle ne l'est jamais totalement chez les  $L^-$  habituels qui présentent toujours une certaine proportion de mutants  $L^+$  [42].

TABLEAU II. — Caractères phénotypiques relatifs à l'utilisation du lactose comme source d'énergie et à la biosynthèse de la  $\beta$ -galactosidase chez *E.coli*.

PHÉNOTYPES	UTILISATION DU LACTOSE (caractère L)	SYNTHÈSE DE LA $\beta$ -GALACTOSIDASE	
		spontanée (c)	induite (i)
L + i . . . . .	+	0	+
L + e . . . . .	+	+	-
L - r . . . . .	0	0	+
L - i . . . . .	0	+	-
L - « absolu » . . .	0	0	0

Ceci s'expliquerait bien si on admettait que les phénotypes L<sup>-e</sup>, L<sup>+e</sup>, L<sup>+i</sup> et L<sup>-i</sup> correspondent à des allélotypes ou pseudo-allélotypes d'un même locus indispensable à la synthèse de la galactosidase et qui serait perdu chez le mutant L<sup>-</sup> *absolu*. Cette interprétation serait pleinement en harmonie avec les observations de J. et E. Lederberg [7, 13] indiquant que chez *E. coli* K12 la mutation « constitutive » est associée au locus complexe lac<sub>1</sub>, responsable également de divers types de mutations L<sup>+</sup> → L<sup>-</sup>.

Nous avons effectué un certain nombre de croisements chez *E. coli* K12 entre des souches L<sup>+e</sup> et L<sup>-i</sup> (1) et n'avons dénombré qu'une très faible proportion de « recombinants » : deux L<sup>+i</sup> et un L<sup>-e</sup> sur 1 000 isolements de prototrophes. Ce faible nombre ne permet pas d'affirmer qu'il ne s'agissait pas de mutants.

#### CONCLUSIONS ET DISCUSSION.

I. — Le succès de la méthode de sélection dont nous avons décrit ici le principe et les résultats justifie les prémisses hypothétiques sur lesquelles elle se fondait, à savoir :

a) L'existence de mutations spontanées :



b) L'avantage sélectif des mutants constitutifs sur les mutants « inductibles », limité à la période d'adaptation de la culture.

En revanche, il est évident que la conception proposée par Hinshelwood et son école [14, 15] pour expliquer l'acquisition de

(1) En utilisant les symboles adoptés pour désigner les loci génétiques chez *E. coli* K 12, ce croisement s'écrirait Lac<sup>+</sup> Cst<sup>+</sup> × Lac<sup>-</sup>, Cst<sup>-</sup>.

propriétés stables nouvelles dans des populations bactériennes par « entraînement » graduel, ne saurait, en aucune façon, rendre compte du résultat obtenu, en particulier du fait que les cultures maintenues uniquement en lactose ou en maltose n'acquièrent pas le caractère  $L^e$  ou  $M^e$ , tandis que les cultures systématiquement désadaptées l'acquièrent rapidement.

II. — Il semble que la proportion de mutants  $L^e$  dans les populations  $L^i$  soit assez élevée pour que l'activité galactosidase « de base » de ces populations puisse être due uniquement aux individus mutants  $L^e$ . Il est donc possible, sinon vraisemblable, que chez les bactéries  $L^i$  la synthèse spontanée d'enzyme soit absolument nulle. Le fait que la plupart des enzymes les plus typiquement inducibles sont également présents à l'état de traces chez les bactéries cultivées en absence d'inducteur suggérerie que l'inducteur n'avait qu'un rôle régulateur dans la synthèse de l'enzyme. L'interprétation que nous proposons ici de l'activité de base implique que chez les bactéries  $L^i$  l'induction ne se traduit pas seulement par l'accroissement d'une protéine-enzyme (galactosidase) préexistante, mais par l'apparition d'un enzyme absent jusque là. Cette interprétation conduit à assigner à l'inducteur un rôle essentiel dans la synthèse de la protéine-enzyme. (Voir Monod et Cohn [11] et Monod [16].)

III. — S'il en est ainsi, quelle peut être la modification physiologique primaire à quoi est liée la transformation  $i \rightarrow c$ ? Si l'on admet que les mécanismes de synthèse de l'enzyme « induit » et de l'enzyme « constitutif » sont essentiellement les mêmes, ce qui est extrêmement vraisemblable, on doit supposer que les bactéries  $L^e$  possèdent la capacité de synthétiser spontanément un galactoside-inducteur. L'idée que dans la synthèse des enzymes « constitutifs » il intervient *en règle générale* un « inducteur intracellulaire » jouant le même rôle que l'inducteur exogène pour les enzymes induits a été déjà développée et discutée [17, 18]. Cette hypothèse a trouvé récemment une intéressante justification expérimentale dans les travaux de Vogel et Davis [19]. Ces auteurs ont obtenu expérimentalement un mutant ( $X^-$ ) d'*E. coli* incapable de synthétiser un précurseur ( $X$ ) de l'ornithine et chez lequel l'enzyme permettant l'utilisation du corps  $X$  est passé du type constitutif (type sauvage [ $X^+$ ]) au type inducible (mutant [ $X^-$ ]). La mutation décrite par Vogel et Davis se traduit en somme par un effet phénotypique exactement inverse de celui des mutations que nous avons étudiées ici. Il est logique de supposer que l'effet primaire, inconnu dans notre cas, est l'inverse de l'effet primaire observé pour la mutation  $X^+ \rightarrow X^-$ .

IV. — Il semble vraisemblable que le locus génétique de la mutation  $L^i \rightarrow L^e$  soit, sinon identique, du moins étroitement voisin du locus dont dépend la mutation spontanée  $L^- \rightarrow L^+$  (locus

désigné lac<sub>1</sub> chez *E. coli* K12), laquelle affecte à la fois l'« accessibilité » de l'enzyme *in vivo* et son inductibilité par certains galactosides (*cf.* Monod et Cohn [41]).

L'accessibilité et l'inductibilité de l'enzyme apparaissent ainsi génétiquement liées, ce qui ne fait qu'accentuer le paradoxe que représentent les bactéries L<sup>-o</sup>, qui synthétisent spontanément un enzyme très actif *in vitro*, mais totalement inopérant *in vivo*. La nature de l'effet primaire des mutations de ce locus demeure totalement obscure. Mais il semble que la perte de ce locus se traduise par la disparition totale de la capacité de synthétiser la β-galactosidase.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. MONOD, A.-M. TORRIANI et J. GRIBETZ. *C. R. Acad. Sci.*, 1948, **227**, 315.
- [2] M. COHN et J. MONOD. *Biochim. Biophys. Acta*, 1951, **7**, 153.
- [3] J. MONOD et A.-M. TORRIANI. *C. R. Acad. Sci.*, 1948, **227**, 240.
- [4] M. DOUDOROFF, W. Z. HASSID, E. W. PUTNAM, A. L. POTTER et J. LEDERBERG. *J. Biol. Chem.*, 1949, **179**, 921.
- [5] J. MONOD et A. M. TORRIANI. *Ces Annales*, 1950, **78**, 65.
- [6] J. MONOD, G. COHEN-BAZIRE et M. COHN. *Biochim. Biophys. Acta*, 1951, **7**, 585.
- [7] J. LEDERBERG. In *Genetics in the 20th Century*, 1951, Mac Millan, New-York, 263-289.
- [8] J. MONOD et A. AUDUREAU. *Ces Annales*, 1946, **72**, 868.
- [9] M. SEIDMAN et K. P. LINK. *J. Am. Chem. Soc.*, 1950, **72**, 4324.
- [10] J. MONOD. *Ann. Rev. Microb.*, 1949, **3**, 371.
- [11] J. MONOD et M. COHN. *Adv. Enzymol.*, 1952, **13**, 67.
- [12] F. J. RYAN. *J. Gen. Microb.*, 1952, **7**, 69.
- [13] E. M. LEDERBERG. *Genetics*, 1952, **37**, 469.
- [14] C. N. HINSHELWOOD et S. JACKSON. *Proceed. Roy. Soc. B.*, 1950, **137**, 88.
- [15] S. JACKSON et C. N. HINSHELWOOD. *Proceed. Roy. Soc. B.*, 1949, **136**, 562.
- [16] J. MONOD. II<sup>e</sup> Congrès de chimie biologique, Paris, 1952.
- [17] J. MONOD. *Growth*, 1947, **11**, 223.
- [18] R. Y. STANIER. *Ann. Rev. Microb.*, 1951, **5**, 35.
- [19] H. J. VOGEL et B. D. DAVIS. *Feder. Proceed.*, 1952, **11**, 484.

# SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(*Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15°.*)

**Séance du 5 Mars 1953.**

Présidence de M. GASTINEL.

---

## NÉCROLOGIE

### SERGE WINOGRADSKY

(1856-1953)

---

En ouvrant la séance, le Président annonce la mort du professeur Serge Winogradsky, directeur de la filiale de Brie-Comte-Robert de l'Institut Pasteur, décédé le 24 février 1953.

L'Assemblée et le Bureau de l'Institut Pasteur, qui assiste à la séance, se lèvent pour entendre la biographie et l'éloge du savant disparu prononcés par le Secrétaire général (1).

Au nom de la Société tout entière et de l'Association des Microbiologistes de Langue française, le Président s'associe à l'hommage rendu à Serge Winogradsky et exprime ses condoléances à sa famille.

## PRÉSENTATION D'OUVRAGE

**M. P. Hauduroy :** J'ai l'honneur d'offrir à la Société des Microbiologistes de Langue française, au nom de mes collaborateurs et en mon nom, la nouvelle édition du « Dictionnaire des bactéries pathogènes pour l'homme, les animaux et les plantes » (2), suivi de la « Liste des êtres microscopiques conservés dans les collections de cultures types ».

On trouvera dans cet ouvrage la description complète, selon un plan

(1) L'allocution de M. Lépine est publiée dans ces *Annales*, p. 667.

(2) Paul Hauduroy, Ehringer, Guillot, Magrou, Prévot, Rosset et Urbain. 1 vol., Masson et Cie, édit., Paris, 1953.

uniforme, des bactéries pathogènes. Morphologie, colorabilité, caractères culturaux, biochimiques, structure antigénique, pouvoir pathogène naturel et expérimental, méthodes de vaccination et de sérothérapie sont étudiés tout à tour.

Plusieurs systèmes de nomenclature existent à l'heure actuelle dont aucun n'est encore reconnu officiellement. Aussi avons-nous adopté le système français mis au point par A.-R. Prévot. Bien entendu, les autres systèmes sont indiqués à titre de documentation.

Les synonymes des noms des bactéries sont cités à leurs places alphabétiques et renvoient toujours à la dénomination adoptée.

Enfin, nous avons pensé rendre service aux bactériologues en indiquant à la suite du nom de chaque microbe si celui-ci se trouvait ou ne se trouvait pas dans une collection de cultures types.

La documentation existant au Centre de Collection de Types microbiens de Lausanne, que dirige l'un de nous, a permis de mener à bien ce travail et d'établir une liste de plus de 10 000 noms d'êtres microscopiques conservés dans les collections, liste qui termine l'ouvrage.

Tel qu'il est conçu, nous espérons que ce « Dictionnaire » rendra service aux hommes de laboratoire, qu'ils soient médecins, vétérinaires ou phyto-pathologistes.

## COMMUNICATIONS

### LA RÉSISTANCE DE DIVERSES BACTÉRIACÉES A L'ÉGARD DE L'ILOTYCINE

par C. LEVADITI et J. HENRY-EVENO.

(Institut Alfred-Fournier.)

L'ilotycine (antibiotique élaboré par le *Streptomyces erythreus* et découvert par Mc Guire, Bunch, Anderson, Boaz, Flynn, Powell et Smith [1]), mise en présence de certains microorganismes, est-elle capable de faciliter l'apparition *in vitro* de germes ilotycino-résistants ? Certains auteurs, tels Mc Guire et ses collaborateurs (*loc. cit.*), de même que Haight et Finland [2], l'affirment à la suite de tentatives effectuées avec le *Staphylococcus aureus* et le *Streptococcus pyogenes*. Ces derniers chercheurs constatent, en effet, que des staphylocoques sont capables, après 3 à 12 passages consécutifs, d'acquérir une résistance cinq cent douze fois supérieure à celle qu'ils présentaient avant tout contact avec l'antibiotique. Ayant eu l'occasion d'étudier les propriétés de l'ilotycine aussi bien dans le tube à essais qu'*in vivo* [3], nous avons évalué l'état réfractaire acquis par divers germes à l'égard de cet antibiotique. Nous résumons dans la présente note l'ensemble de nos constatations. Deux groupes de bactériacées ont été envisagés de ce point de vue : 1<sup>o</sup> *Eberthella typhosa*, *Proteus vulgaris* et *Escherichia coli* ; 2<sup>o</sup> 6 souches de *Staphylococcus aureus* : Tw, Gen, F, H,

PHASES	NOMBRE DE PHASES									
	1 <sup>e</sup>	2 <sup>e</sup>	3 <sup>e</sup>	4 <sup>e</sup>	5 <sup>e</sup>	6 <sup>e</sup>	Durée (1) (en jours)	Durée (2) (en jours)	Durée (3) (en jours)	Durée (4) (en jours)
MICROORGANISMES										
<i>Eberthella typhosa</i> O.	10	2	7	De 40 à 400.	11 à 13 De 400 à 1 000.					
<i>Proteus vulgaris</i>	100	2	13	De 100 à 500.	13 à 15 De 500 à 1 000.					
<i>Escherichia coli</i> S.	100	3	15	De 400 à 250.	15 à 17 De 250 à 500.	17 à 21 De 500 à 1 000.				
Tw.	500	4	6	De 500 à 1 000.						
Gen. (2).	500	1	6	De 500 à 1 000.						
F.	100	3	3	De 400 à 250.	3 à 6 De 250 à 500.	6 à 7 De 500 à 1 000.				
<i>Staphylococcus aureus.</i>	100	3	3	De 400 à 200.	3 à 7 De 200 à 500.	7 à 8 De 500 à 1 000.				
T.	1	6	3	De 1 à 10.	3 à 6 De 40 à 50.	6 à 7 De 50 à 100.	7 à 8 De 50 à 250.	8 à 11 De 40 à 250.	11 à 13 De 25 à 500.	11 à 13 à 1 000.
Oxf.	1	4	13	De 1 à 10.	43 à 17 De 1 à 25.	17 à 32 De 40 à 50.	25 à 32 De 40 à 50.	32 à 34 De 50 à 50.	34 à 100.	34 à 100.

(1) Nombre de jours écoulés depuis le début de l'essai.  
(2) Souche pénicillino-résistante.

T et Oxf, les deux premières s'étant révélées manifestement réfractaires d'emblée [ $Dmb$  (1) = 500 µg]. La technique utilisée a été celle des repiquages en série, en présence de concentrations progressivement croissantes d'antibiotique, technique classique (titrages aussi serrés qu'il était nécessaire). Les transferts ont été continués jusqu'à ce que

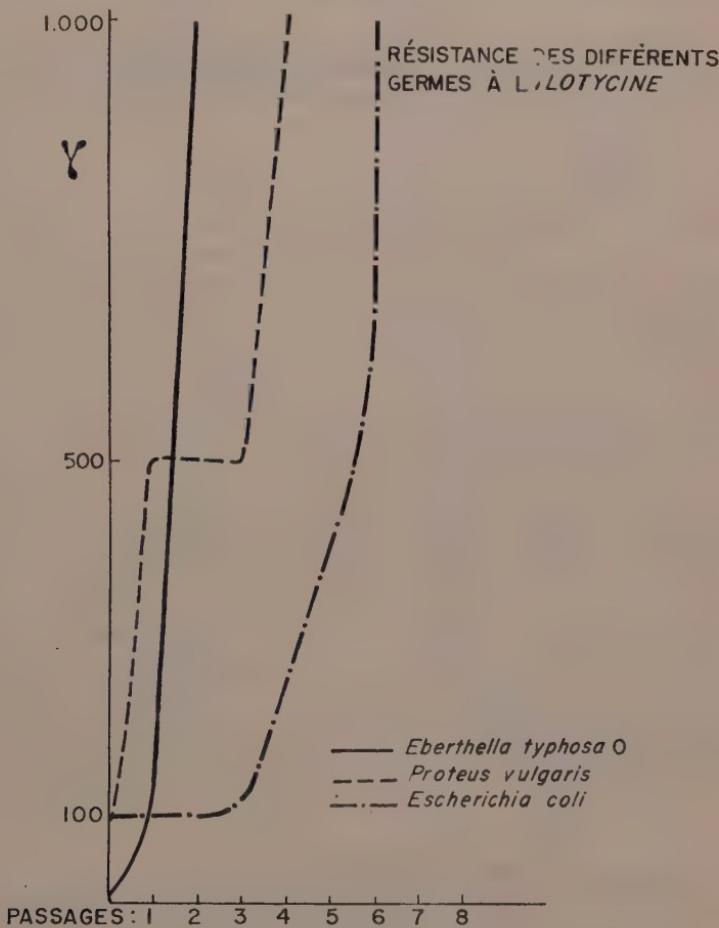


FIG. 1.

la  $DMr$  (1) ait atteint 1 000 µg par centimètre cube [dans un cas (Staph. Oxf.), ils ont été arrêtés à 100 µg, résistance maxima atteinte].

*Résultats.* — Les données enregistrées sont consignées dans le tableau ci-joint et représentées graphiquement dans les tracés 1 et 2.

(1) Nous désignons par les abréviations  $Dmb$  la dose minima bactériostatique, et  $DMr$  la dose maxima permettant la poussée du germe.

En règle générale, la résistance s'est accrue en plusieurs phases successives, en d'autres termes par paliers. Le nombre de ces phases a varié entre 2 et 6, selon les bactéries prises en considération. Dans le tableau, les microorganismes cités précédemment sont examinés : 1<sup>o</sup> du point

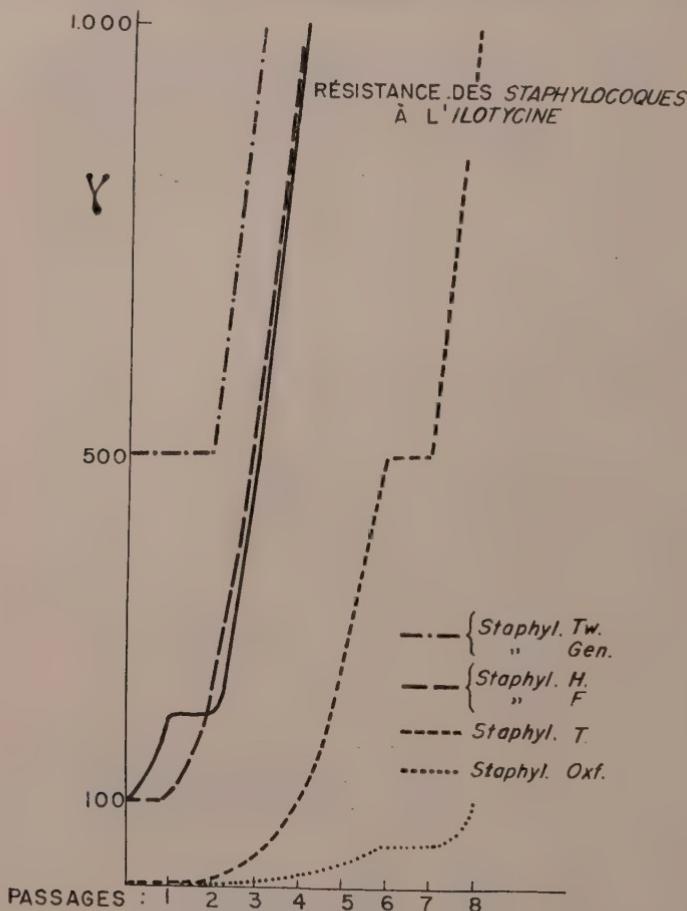


FIG. 2.

de vue de la *Dmb* au point de départ ; 2<sup>o</sup> du nombre des phases ; 3<sup>o</sup> de la durée de l'expérience correspondant à chacune de ces phases, ainsi que des valeurs respectives de la *DMr* ; 4<sup>o</sup> de la durée totale de l'essai, et 5<sup>o</sup> de la *DMr* atteinte finalement.

La lecture de ce tableau, ainsi que des tracés 1 et 2, montre ce qui suit :

A. Groupe : *Eberthella typhosa*-*Proteus vulgaris*-*Escherichia coli* S. —

Les deux premiers de ces germes, dont la  $Dmb$  était, respectivement, de 10 et 100 µg, ont acquis l'état réfractaire en deux phases, et cela en treize et quinze jours, la  $DMr$  passant de 100 et 500 à 1 000 µg. Le troisième (*Escherichia coli* S) a exigé trois phases évoluant en vingt et un jours pour que la  $DMr$  atteigne 1 000 µg. Il en résulte que ces bactériacées sont susceptibles de devenir facilement et intensément réfractaires à l'ilotycine.

*B. Groupe : Staphylococcus aureus.* — a) Germes relativement insensibles d'emblée. Se sont montrées assez réfractaires *ab ovo* les souches Tw et Gen, puisqu'elles ont exigé une  $Dmb$  atteignant 500 µg avant tout contact avec l'ilotycine. Ces souches staphylococciques ont présenté une  $DMr$  de 1 000 µg après une seule phase, en l'espace de six jours.

b) Deux souches staphylococciques (F et H), dont la  $Dmb$  atteignait 100 µg, sont devenues insensibles ( $DMr = 1 000$  µg) en trois phases consécutives et en l'espace de sept à huit jours.

c) Enfin, deux autres souches (T et Oxf), éminemment sensibles à l'antibiotique ( $Dmb = 1$  µg), ont acquis, l'une (T) un état réfractaire accusé (1 000 µg) en six phases et en l'espace de treize jours, l'autre (Oxf) une résistance faible (100 µg), apparue en quatre phases et en l'espace de trente-quatre jours.

Il en ressort que les diverses souches examinées de *Staphylococcus aureus* se sont comportées différemment quant à leur potentiel de résistance ilotycinique. A côté de celles qui, ayant manifesté un état réfractaire assez intense dès l'origine, ont vu leur potentiel d'insensibilité atteindre rapidement des valeurs fortement élevées, il y a lieu d'en mentionner d'autres moyennement aptes à devenir résistantes, et d'autres, enfin, chez lesquelles cette même aptitude ne s'est déclarée que lentement et en de multiples phases.

**CONCLUSIONS.** — Trois bactériacées (*Eberthella typhosa* O, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli* S), ainsi que 5 souches de *Staphylococcus aureus*, sont susceptibles de devenir (à des degrés divers et en des temps variant d'un germe à l'autre) ilotycino-résistantes. L'état réfractaire que ces germes manifestent semble en rapport avec leur potentiel d'insensibilité initial, potentiel que l'antibiotique exagère par la voie d'une sélection transmissible héréditairement.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] MC GUIRE et coll. *Antib. Chemoth.*, 1952, **2**, 281.
- [2] HAIGHT et coll. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1952, **81**, 183.
- [3] C. LEVADITI, A. VAISMAN et J. HENRY-EVENO. Ces *Annales*, 1953, **84** (sous presse).

## ÉVOLUTION DE LA SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES DES GERMES ISOLÉS CHEZ LES MALADES DE VILLE DE 1949 A 1952

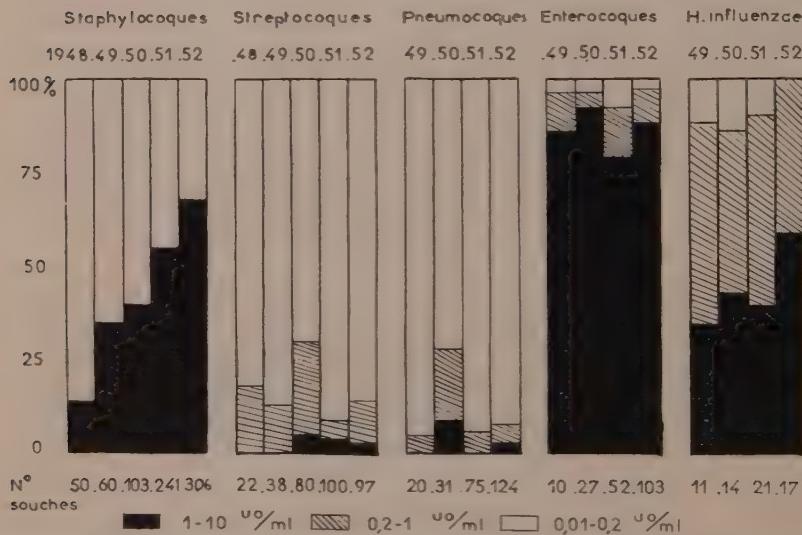
par Y. CHABBERT, G. TERRIAL et M. P. SCHUTZENBERGER.

*(Institut Pasteur.)*

Sous l'influence de l'antibiothérapie intensive pratiquée ces dernières années on s'est attendu à voir apparaître une sélection progressive des souches les plus résistantes.

En milieu hospitalier, la sélection des Staphylocoques résistants à la

### PENICILLINE



Fin. 4

Pénicilline par production de Pénicillinase s'est opérée dès 1949 [1]. Pour les autres antibiotiques : Streptomycine, Auréomycine, Chloramphénicol, Terramycine, nous avons signalé [3] en 1952 un phénomène analogue, avec prédominance de certains types résistants à la plupart des antibiotiques. Des augmentations de pourcentages des souches résistantes ont été observées dans diverses espèces microbiennes [4], mais sans avoir la netteté de celles constatées chez les Staphylocoques.

Mais les observations faites sur les souches isolées dans les hôpitaux représentent un choix, car, d'une part l'hospitalisation est souvent réservée à des malades n'ayant pas réagi aux premiers traitements antibiotiques, et d'autre part on observe souvent de véritables épidémies de salle provoquées par une souche résistante.

Les statistiques rapportées ici proviennent de résultats obtenus avec des souches isolées à Paris chez des *malades de ville non hospitalisés*. Bien qu'un certain nombre de facteurs soient encore susceptibles de

#### STREPTOMYCINE

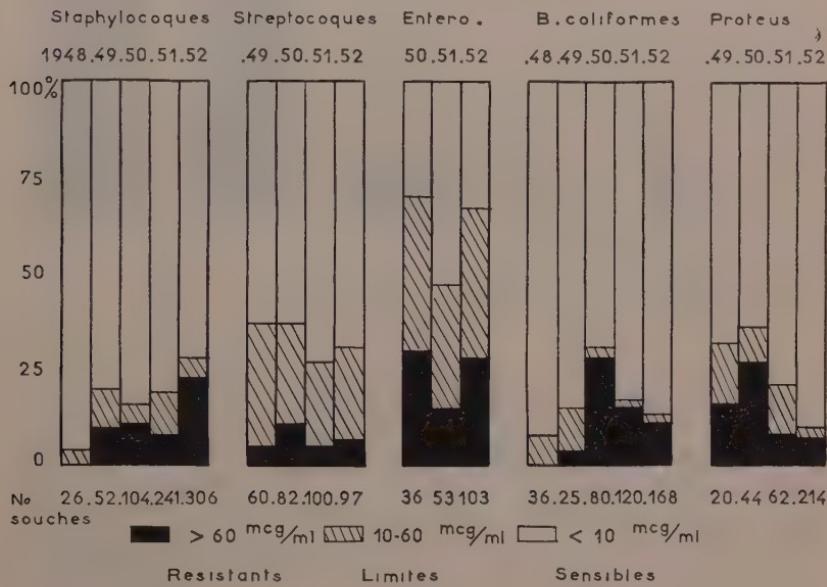


FIG. 2.

jouer, ces statistiques représentent l'évolution qui a pu se produire dans l'ensemble de la population urbaine.

La technique de titrage utilisée est la technique des disques séchés préparés par l'Institut Pasteur. Un résultat chiffré est obtenu par un procédé basé sur les différences de diamètre des zones d'inhibition obtenues entre une souche test et la souche à titrer [2]. Les concentrations inhibitrices ont été ensuite rangées en trois catégories : Sensibles, Limites et Résistantes suivant des taux figurés sur les schémas.

**RÉSULTATS.** — Les *Staphylocoques* occupent une place à part.

Pour la Pénicilline on note une augmentation progressive du pourcentage des souches productrices de Pénicillinase. Compte tenu d'une endémicité qui semble constante, cette augmentation peut s'expliquer

## AUREOMYCINE

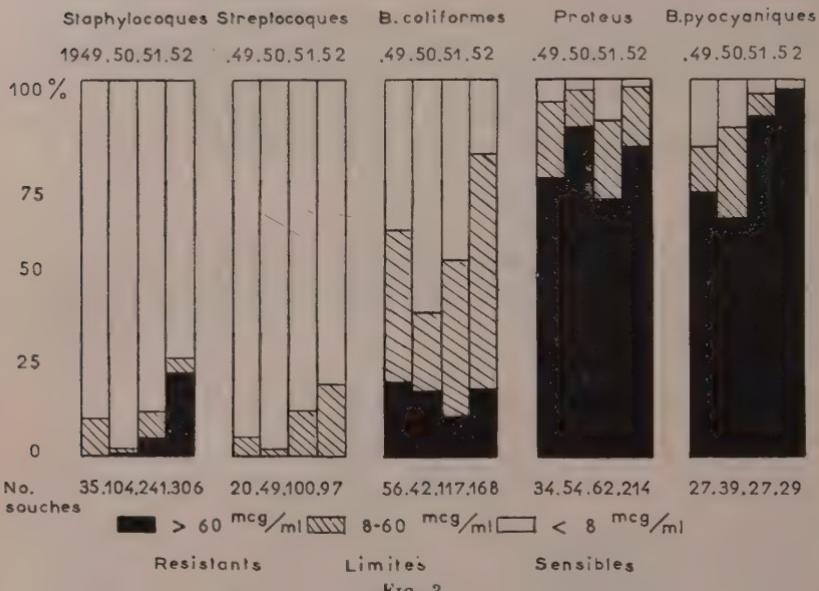


FIG. 3.

## CHLORAMPHENICOL

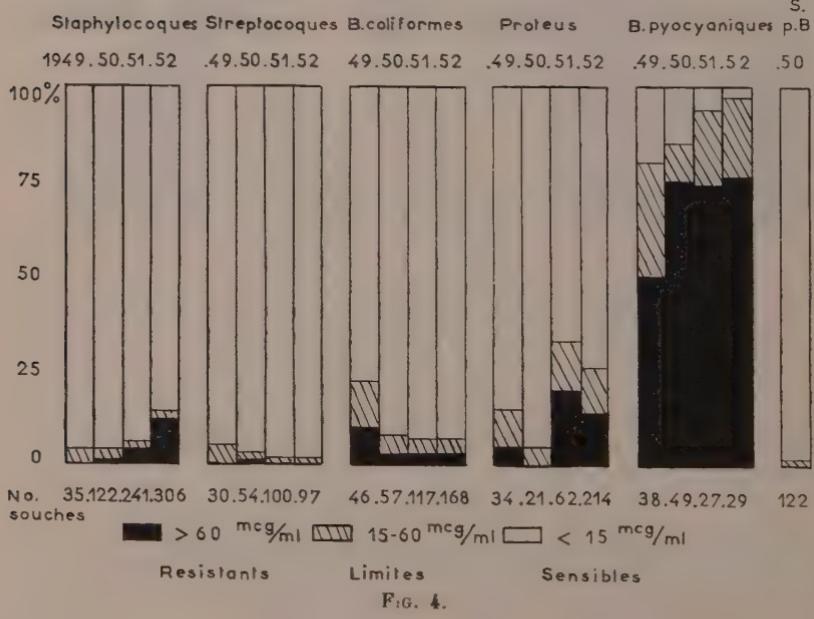


FIG. 4.

soit par un taux d'échanges élevé, soit par la présence sur chaque individu de souches multiples. Le taux observé en 1952 en ville (68 p. 100) est de l'ordre de celui observé en 1949 dans plusieurs hôpitaux. Il y a donc un retard de quatre ans qui peut servir de base pour apprécier l'évolution possible vis-à-vis des autres antibiotiques.

Pour les trois autres antibiotiques étudiés, le pourcentage des souches résistantes était faible et stable (4-8 p. 100) jusqu'en 1952. On observe alors une élévation significative avec des différences qui coïncident avec la fréquence d'utilisation des produits : Streptomycine (23 p. 100), Auréomycine (22 p. 100), Chloramphénicol (12 p. 100). Si cette élévation obéit aux mêmes lois que pour la Pénicilline, on peut s'attendre à une évolution progressive vers la résistance dans les années à venir.

*Streptocoques-Pneumocoques* : De 1949 à 1952, on n'observe pour les quatre antibiotiques aucune augmentation des souches résistantes, leur pourcentage restant toujours très faible ou nul. Pour l'Auréomycine, où l'on n'a pas trouvé de souches résistantes, il y a en 1952 une élévation faible mais significative des souches limites (19 p. 100). Il faut aussi signaler l'augmentation nette du nombre de souches d'Entérocoques isolées en dehors du tractus digestif.

*Bacilles coliformes* : Nous avons groupé sous ce nom les souches appartenant aux genres *Escherichia* et *Klebsiella*. Dans ce groupe on n'observe aucune évolution nette vers la résistance. L'élévation significative observée en 1950 pour la Streptomycine ne s'est pas maintenue ; elle peut avoir coïncidé avec une période où la Streptomycine était utilisée seule sans association.

*Proteus* : Les modifications observées pour le Chloramphénicol ne sont pas significatives. Avec la Streptomycine on retrouve l'élévation transitoire observée en 1950. Le genre est naturellement résistant à l'Auréomycine, mais un faible taux de souches sensibles et limites semble se maintenir.

*Pseudomonas* : *Ps. aeruginosa* était naturellement peu sensible à l'Auréomycine et au Chloramphénicol ; on observe une disparition progressive des souches sensibles.

Il en est de même pour les souches d'*H. influenzae* vis-à-vis de la Pénicilline.

**EN RÉSUMÉ.** — Pour les souches isolées à Paris chez les malades de ville non hospitalisés de 1949 à 1952, seuls les Staphylocoques subissent une évolution significative vers la résistance. Cette évolution a été progressive pour la Pénicilline et ne fait que s'amorcer pour les autres antibiotiques.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] M. BARBER et M. ROZWADOWSKA-DOWZENKO. *Lancet*, 1948, 641.
- [2] Y. CHABBERT. *Ann. Biol. clin.*, 1951, 9, 544.
- [3] Y. CHABBERT et G. TERRIAL. *Ces Annales*, 1952, 83, 499.
- [4] S. S. SCHNEIERSON. *J. Lab. Clin. Med.*, 1952, 40, 48.

## APPARITION SPONTANÉE, PERSISTANTE, DE CORPS GLOBULEUX ET DE FORMES L, A PARTIR D'UNE SOUCHE DE VIBRION CHOLÉRIQUE

par L. CARRÈRE et J. ROUX.

(Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Médecine de Montpellier.)

En partant d'une souche de vibron cholérique, souche Inaba provenant de l'Institut Pasteur de Paris (1948), nous avons été surpris d'obtenir en bouillon ordinaire (pH 6,85) de très nombreux corps globuleux et formes L. Des subcultures, pratiquées successivement, donnaient encore, au septième passage, en bouillon ou en eau peptonée, les mêmes éléments en nombre prédominant sur les formes vibrionniennes.

Nous avons suivi sur prélèvements de cultures, pratiqués à divers intervalles de temps, les processus évolutifs en utilisant, soit, pour l'état frais, le dispositif à contraste de phase, soit des colorations : Giemsa, bleu de Unna, Gram, et en pratiquant des subcultures en divers milieux. Nous pouvons résumer comme suit nos constatations.

Les ensemencements d'une öse de voile ou de dépôt donnent en bouillon ou eau peptonée, une culture paraissant homogène, dans toute la hauteur du milieu ; à l'examen au contraste de phase, on constate dès la quatrième heure, la présence de formes bacillaires très courtes, 1  $\mu$ , en voie de « gonflement » qui prédominent, des formes bacillaires longues, 10 à 20  $\mu$ , en un point desquelles, au centre le plus souvent, s'amorce un « gonflement » ; enfin de rares vibrions très mobiles. La coloration par la méthode de Gram révèle que les éléments bacillaires sont restés colorés par le violet de gentiane, uniformément (formes courtes) ou sous forme de masses séparées par des espaces à Gram négatif (formes longues) ; il existe aussi des formes coccobacillaires présentant un granule central Gram positif entouré d'un halo Gram négatif. Au Giemsa, les éléments Gram positifs sont bleu foncé, les éléments Gram négatifs sont teintés en rose, plus ou moins foncé. Nous ne retiendrons pas actuellement ces constatations qui impliquent des variations dans le métabolisme des nucléo-protéines et nécessitent d'autres recherches.

Dans les heures qui suivent, on peut saisir les phases évolutives des formes globulaires, qui augmentent progressivement de volume, se vacuoisent, et donnent naissance à des formes L ou à des bactéries d'apparence normale. Dans les cultures de trois jours, conservées à 37°, on ne trouve souvent que des formes L, des granules et de rares vibrions. A partir de prélèvements, effectués de la quatrième heure au troisième jour, les subcultures sur bouillon gélosé se montrent constituées par des éléments polymorphes : granules, coccobacilles, longs filaments ondulés, formes massuées ou spiralées ; ce polymorphisme rappelle à s'y méprendre l'aspect de *Streptobacillus moniliformis*. Par isolement sur milieu de Dieudonné, coulé en boîtes de Petri, on

obtient des colonies relativement peu nombreuses (1/10 environ) constituées par des vibrions typiques (mobiles, Gram négatifs) et des colonies dont les éléments présentent, à la vingt-quatrième heure, le polymorphisme décrit. Les subcultures en eau peptonée ou en bouillon des dernières colonies reproduisent, dès la quatrième heure, le cycle évolutif des formes L, tandis que les premières donnent des formes normales de vibron pendant trois jours ; mais, au quatrième jour, apparaissent des corps globuleux, début du cycle évolutif qui se poursuit jusqu'aux formes L.

Par filtration sur bougie Chamberland L3, de cultures de cinq jours en eau peptonée, nous avons obtenu, pour quatre essais, des formes L à l'état pur : le filtrat, d'abord absolument limpide, présente, au deuxième ou au troisième jour, un très fin dépôt tapissant le fond du tube, le transfert de ce dépôt en milieux liquides ou sur milieux solides n'a donné lieu à aucune culture, mais en milieu semi-solide, nous avons obtenu des colonies typiques de formes L, repiquables en série sous cette seule forme.

En ajoutant à des cultures jeunes de la souche de vibron cholérique, de la pénicilline (2 000 unités) et du plasma humain (1 cm<sup>3</sup> pour 10 cm<sup>3</sup>) nous avons obtenu l'évolution en corps globuleux et formes L en un laps de temps moindre, mais une partie seulement des vibrions subit la transformation, un grand nombre disparaissant par lyse. Avec la pénicilline seule les résultats sont semblables, le nombre des vibrions évoluant en corps globuleux paraît, cependant, plus élevé. Il en est de même avec d'autres antibiotiques : terramycine (1,25 µg par centimètre cube), chloramphénicol (1,25 µg par centimètre cube), auréomycine et streptomycine (2,50 µg par centimètre cube).

L'inoculation intrapéritonéale de corps globuleux à un cobaye nous a permis d'observer une exsudation fibrineuse avec très forte réaction polynucléaire se poursuivant pendant quarante-huit heures. L'exsudatensemencé sur bouillon gélosé et en eau peptonée ne nous a donné aucune culture.

L'inoculation intrapéritonéale, sous-cutanée ou intradermique, de corps globuleux, à des souris blanches, a provoqué la mort, en vingt-quatre heures, des animaux inoculés ; nous n'avons pu isoler du sang, de la rate et du foie que de rares colonies d'*E. coli*. Par contre, l'inoculation, par les mêmes voies, de formes L n'a provoqué aucun symptôme chez les souris inoculées, toutes ont résisté ; nous reviendrons ultérieurement sur ces faits.

Nous avons donc constaté l'évolution spontanée en corps globuleux et formes L du plus grand nombre des cellules bactériennes en subculture d'une souche Inaba de vibron cholérique ; cette aptitude évolutive s'est maintenue, même après deux passages sur milieu Dieu-donné, dans la série des subcultures successives.

S'agit-il d'une mutation ou d'une sélection ?

Querelle de mots sans doute, car, mutant ou sélectionné, l'individu évoluant porte génétiquement cette potentialité qui se transmet dans ou par une lignée au moins de ses descendants.

Remarquons que les cellules composant les vieilles cultures de diverses souches bactériennes (plus particulièrement pour le vibron cholérique) présentent souvent un polymorphisme notable : parmi les

formes, dites anormales, on peut détecter de vrais corps globuleux susceptibles d'évoluer en forme L.

Divers auteurs, Tulasne en particulier [1], ont cependant noté que les souches récemment isolées étaient plus aptes à la production « incitée » de formes L, que les souches conservées repiquées fréquemment ; nous avons émis à ce sujet une hypothèse [2]. Le fait que nous rapportons n'est pas antinomique ; n'avons-nous pas observé que, pour notre souche, la formation des corps globuleux est moindre en présence de pénicilline-plasma, une partie des bactéries étant lysée avant l'obtention de ce stade ? On conçoit qu'il s'agit donc, simplement, de quantités proportionnelles d'individus aptes ou non à évoluer en corps globuleux et de leur sensibilité à l'antibiotique dans le cas de la pénicilline.

Si, lors des subcultures de diverses souches, les formes normales paraissent seules se multiplier, c'est que leur nombre est considérablement plus élevé au départ et que les conditions extérieures leur sont plus favorables. Par divers procédés, on peut inverser complètement les choses, supprimant ou gênant la scissiparité, mode de reproduction rapide habituel, faire apparaître — sélectionner — les bactéries à potentialité évolutive vers les formes L ; le cycle évolutif lui-même pouvant être stoppé, ou dévié, au cours des phases successives. on pourra, ainsi, n'obtenir que des stades de corps globuleux, jeunes ou plus ou moins évolués, qui disparaissent, ou bien voir le cycle dérouler ses phases et, après vacuolisation, donner naissance aux formes L ou aux formes bactériennes habituelles.

La lecture des nombreux travaux, comme nos propres recherches, nous incitent à penser que le corps globuleux, cellule complète : noyau, protoplasme, est une forme de résistance, comparable, nous l'avons dit, à un kyste de protozoaire [3], révélée lorsque les individus composant une souche sont soumis à diverses actions : épuisement du milieu, antibiotiques...

Cette hypothèse vérifiée, on peut en émettre une autre. L'ontogénie reproduisant la phylogénie, le corps globuleux, avec sa bivalence évolutive, apparaît comme une plaque tournante. Ne peut-il pas être considéré aussi comme la « résurgence » ou la « réplique pérenne » de la cellule ancestrale, origine de l'espèce considérée ou même de toutes les espèces bactériennes. Ce monisme n'a rien d'inraisemblable *a priori*, en considération de la plasticité et de l'adaptabilité microbienne.

Sans vouloir discuter plus avant, il nous semble, en conclusion, que l'étude des formes L, stade terminal d'un cycle, présente un intérêt quant à la pathogénie de certaines affections ou comme phase de transition possible entre bactéries et virus ; ce sont les recherches sur les corps globuleux mêmes qui seront les plus fructueuses, en nous donnant quelques clartés sur l'origine et le cycle vital des bactéries.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] R. TULASNE. *Rev. Immunol.*, 1951, **45**, 223.
- [2] L. CARRÈRE et J. ROUX. *Ces Annales*, 1953, **84**, 796.
- [3] L. CARRÈRE. *C. R. Soc. Biol.*, 1952, **146**, 522.

**RECHERCHES SUR LES VENINS  
DE NAJA HAJE,  
DE NAJA NIGRICOLLIS, DE LACHESIS GRAMINEUS  
ET D'ANCISTRODON PISCIVORUS**

par Y. IZARD et P. BOQUET.

(Institut Pasteur, Garches.)

Nous résumons ci-dessous les résultats d'expériences entreprises dans le dessein de comparer les propriétés toxiques, enzymatiques et anti-géniques de quatre échantillons de venins de serpents.

Les deux premiers proviennent de vipéridés : *Ancistrodon piscivorus* d'origine américaine et *Lachesis gramineus* du sud-est asiatique ; les deux autres, de colubridés capturés en Guinée Française : *Naja haje* et *Naja nigricollis* [1].

Ces quatre échantillons de venins, à l'état sec, se présentent sous la forme de paillettes jaunes, très solubles dans la solution physiologique de chlorure de sodium. Dans une première série d'expériences, nous déterminons, pour les petits animaux de laboratoire, la dose minima mortelle de chacun de ces poisons ; nous étudions ensuite *in vitro* leurs activités enzymatique, lécithinasique, coagulante et anti-coagulante, en suivant les techniques que nous avons décrites à propos des venins de vipères et de cobras [1].

Dans une seconde série d'expériences, nous comparons sur les mêmes échantillons de venins, les actions antitoxiques et antienzymatiques paraspécifiques de deux sérum thérapeutiques antivenimeux préparés à l'Institut Pasteur : le sérum ER et le sérum C obtenus en hyper-immunisant des chevaux au moyen des venins de *Vipera aspis* d'Europe et de *Naja naja* d'Indochine.

L'antitoxine antivenimeuse est titrée suivant la méthode d'Ipsen [2] qui consiste à injecter par la voie veineuse, à des souris du poids moyen de 18 g, des mélanges en proportions variables de venin et d'antivenin.

Les activités anti-enzymatiques des immunserums sont mesurées *in vitro* par les procédés que nous avons résumés dans un précédent mémoire [1].

Les résultats de ces recherches sont groupés dans les tableaux I, II, III, IV.

Il ressort de ces observations que les venins de *Lachesis gramineus* et d'*Ancistrodon piscivorus* ne sont pas très toxiques pour les petits rongeurs. Injectés à des lapins par la voie veineuse, à la dose de

(1) Ces deux échantillons nous ont été adressés par le Dr Lefrou, directeur de l'Institut Pasteur de Kindia, à qui nous exprimons tous nos remerciements.

TABLEAU I. — Toxicité des venins de *L. gramineus*, d'*A. piscivorus*, de *N. haje* et de *N. nigricollis* pour le lapin, le cobaye et la souris.

(À titre de comparaison nous indiquons la toxicité des venins de *Vipera aspis* de France et de *Naja naja* d'Indochine).

DOSES MINIMA MORTELLES (exprimées en mg)					
des venins énumérés dans la colonne précédente :					
	pour le lapin (par kg d'animal) éprouvé par la voie veineuse	pour le cobaye de 350 g éprouvé par la voie sous- cutanée	pour la souris de 20 g éprouvée par		
			la voie veineuse		la voie sous-cutanée
<b>Venins de :</b>					
<b>Vipéridés :</b>					
<i>Lachesis gramineus</i> . . .	2	1	0,2	0,3	
<i>Ancistrodon piscivorus</i> . . .	2 (échantillon ancien). 2 (échantillon nouveau).	4	0,15	0,4	
<i>Vipera aspis</i> . . . . .	0,35	2	0,10	0,10	
<b>Colubridés :</b>					
<i>Naja haje</i> . . . . .	0,6	0,8	0,75	0,02	
<i>Naja nigricollis</i> . . . . .	0,3	0,2	0,015	0,01	
<i>Naja naja</i> . . . . .	0,2	0,2	0,010	0,015	

2 mg par kilogramme, ils produisent des troubles respiratoires, nerveux et sanguins, comparables à ceux qu'on observe après l'injection d'une dose non mortelle de venin de *Vipera aspis*. Nous ne disposions pas de quantités suffisantes de ces poisons pour déterminer, dans les mêmes conditions, la dose létale de chacun d'eux, mais, en nous fondant sur l'importance des phénomènes pathologiques qu'ils provoquent, nous sommes autorisés à conclure de nos expériences que le venin d'*Ancistrodon* est moins nocif que celui de *Lachesis* et que la dose minima mortelle de ce dernier est vraisemblablement voisine de 2 mg par kilogramme (2). Quant à la faible activité du venin d'*Ancistrodon*, la question se pose de savoir si elle est la conséquence d'une altération de ce poison au cours de sa conservation (3) ou si elle est inhérente à sa nature même. Les résultats des expériences faites au moyen d'un échantillon de venin d'*A. piscivorus* recueilli depuis peu, plaident en faveur de la seconde hypothèse ; de même,

(2) Selon G. Lamb (cité par M. Phisalix dans « Les animaux venimeux et les venins ») la dose minimum mortelle de venin de *L. gramineus* administrée au lapin par la voie veineuse est 2 mg par kilogramme.

(3) La date du prélèvement de cet échantillon de venin ne nous est pas connue. Elle est antérieure à 1939.

TABLEAU II. — Activités enzymatiques *in vitro* des venins de *L. gramineus*, de *N. haje*, de *N. nigricollis* et d'*A. piscivorus*.

(A titre de comparaison nous indiquons les activités enzymatiques des venins de *Vipera aspis* et de *N. naja*.)

	DOSES MINIMA DE VENIN (exprimées en mg)		
	produisant en présence de 0,5 cm <sup>3</sup> de sérum de cheval, la quan- tité minima de lyso- cithine nécessaire pour hémolyser 1 cm <sup>3</sup> d'une suspension à 5 p. 100 de G.R. de cheval. Temps de contact venin + sérum : 1 h. à 37°. Hémolyse ; lecture après 30 min. à 0°.	coagulant 2 cm <sup>3</sup> de plasma de cheval (citraté et recalcifié)	empêchant la coagulation de 2 cm <sup>3</sup> de plasma de cheval (citraté et recalcifié)
(lecture après 30 minutes à 37°)			
Venins de :			
<i>Vipéridés :</i>			
<i>Lachesis gramineus</i> . . .	0,1	0,001	
<i>Ancistrodon piscivorus</i> . . .	0,01		0,04
<i>Vipera aspis</i> . . . . .	0,0005	0,001	0,25
<i>Colubridés :</i>			
<i>Naja haje</i> . . . . .	0,0004		0,00007
<i>Naja nigricollis</i> . . . . .	0,0004		0,001
<i>Naja naja</i> . . . . .	0,0004 (1)		0,01

(1) Echantillon ancien (1934).

le fait que la morsure par *Ancistrodon* n'est pas toujours mortelle en dépit de la quantité importante de venin que le serpent injecte à sa victime (4).

Lorsqu'ils sont administrés à des cobayes de 350 g par la voie sous-cutanée, les mêmes venins d'*A. piscivorus* et de *L. gramineus* produisent en quelques heures, à la dose de 1 mg, un vaste placard d'œdème dont le centre se nécrose.

Deux dixièmes de milligramme (0,2 mg) de venin de *Lachesis gramineus*, ou 0,15 mg de venin d'*Ancistrodon piscivorus*, administrés par la voie veineuse, tuent en moins de douze heures des souris blanches de 20 g. Il faut dix fois moins de venin de *Vipera aspis* pour produire le même effet.

Les venins des deux colubridés africains sont, au contraire, beaucoup plus toxiques. Lorsqu'on les injecte au lapin, au cobaye ou à la souris, ils produisent des accidents semblables à ceux de l'envenimation par le poison du Cobra d'Indochine (*Naja naja*). Cependant il

(4) Cette quantité correspond à 98 mg de venin sec (Th. GITHENS, J. Immunol., 1935, 29, 165).

TABLEAU III. — Essais de neutralisation *in vivo* des propriétés toxiques des quatre échantillons de venins étudiés, par les sérum hétérologues ER et C.

(Technique d'Ipsen : épreuve sur la souris de la toxicité de mélanges, en proportions variables, de venin et de sérum).

NATURE DU SÉRUM	ORIGINE DU VENIN	POIDS DE VENIN (exprimé en mg) neutralisé par 1 cm <sup>3</sup> de sérum	DOSSES minima mortelles de venin neutralisées par 1 cm <sup>3</sup> de sérum
<b>Antivenin de :</b>			
<i>Naja naja</i> . . . . .	Vipéridés. { <i>L. gramineus</i> . <i>A. piscivorus</i> .	0,0 0,0	
<i>C. 1311 + 1315 (12947)</i> . . .	Colubridés. { <i>N. haje</i> . <i>N. nigricollis</i> . <i>Naja naja</i> .	0,2 0,0 0,5	10 40
<b>Antivenin de :</b>			
<i>Vipera aspis</i> ER. 872 (14147).	Vipéridés. { <i>L. gramineus</i> . <i>A. piscivorus</i> . <i>V. aspis</i> .	0,0 0,6 1,0	4 10

TABLEAU IV. — Essais de neutralisation *in vitro* par les sérum anti-venimeux ER et C, des enzymes (lécithinase, coagulase, facteurs anticoagulants) contenus dans les mêmes venins.

1 CM <sup>3</sup> DE SÉRUM C [anti-venin de <i>Naja naja</i> ] (1)		1 CM <sup>3</sup> DE SÉRUM ER [anti-venin de <i>Vipera aspis</i> ] (1)		
Neutralise les activités enzymatiques des venins exprimées en doses minima				
Hémolysantes	Anti-coagulantes	Hémolysantes	Anti-coagulantes	Coagulantes
<i>L. gramineus</i> . . . . .	0	0		
<i>A. piscivorus</i> . . . . .	0	0	0	2 000
<i>V. aspis</i> . . . . .		5 000		4 000
<i>N. haje</i> . . . . .	42	41	2	
<i>N. nigricollis</i> . . . . .	300	70	1,2	
<i>Naja naja</i> . . . . .	1 000	150		

(1) Sérum C 1311 + 1315 (12947); Sérum ER 872 (14147).

faut injecter plus de venin de *Naja haje* que de venin de *Naja nigricollis* ou de venin de *Naja naja* pour tuer ces rongeurs dans les mêmes délais.

Administrés par la voie sous-cutanée, les venins des deux colubridés étudiés sont légèrement nécrosants.

Si on compare entre eux les résultats des expériences *in vitro*, on constate que le poison de *Lachesis gramineus* est moins hémolytique que celui de *Vipera aspis*, et que le venin de *Naja haje* est plus anti-coagulant que celui de *Naja nigricollis*.

De l'étude des propriétés antitoxiques et anti-enzymatiques des deux sérum antivenimeux C et ER, il résulte que le sérum C, antivenin de *Naja naja*, à la dose de 1 cm<sup>3</sup>, rend inoffensives dix doses mortelles de venin de *Naja haje*, alors que, dans les mêmes conditions, il neutralise 40 doses mortelles d'antigène homologue pour la souris éprouvée par la voie veineuse. En dépit de ses propriétés anti-lécithinasiques à l'égard du venin de *Naja nigricollis*, le même sérum C ne supprime pas la neuro-toxicité de ce poison pour la souris. Enfin, il est sans action sur les venins des deux vipéridés : *Lachesis gramineus* et *Ancistrodon piscivorus*. Quant au sérum ER, dont 1 cm<sup>3</sup> neutralise 50 doses mortelles pour la souris, 1 000 « doses hémolytiques » et 25 000 « doses coagulantes » de venin homologue de *Vipera aspis*, il ne diminue pas l'activité lécithinasique du poison du *Lachesis gramineus* et il ne protège pas la souris contre l'action nocive de ce venin, mais il rend inoffensive pour ces rongeurs une quantité de venin d'*Ancistrodon* égale à 4 doses létales, sans neutraliser sa lécithinase.

**CONCLUSION.** — *Lachesis gramineus*, vipéridé du sud-est asiatique, sécrète un venin nécrosant. *In vitro* ce poison coagule le plasma recalcifié et il lyse les globules rouges de cheval en présence des lécithines sériques. Le venin d'*Ancistrodon piscivorus* d'origine américaine est également nécrosant et lécithinasique, mais il ne coagule pas le plasma recalcifié.

Le sérum ER qui neutralise spécifiquement le venin de *Vipera aspis* est doué d'un faible pouvoir antitoxique paraspécifique à l'égard du poison du vipéridé américain. Il est sans action sur celui de *Lachesis gramineus*. Quant aux venins des deux colubridés africains, *Naja haje* et *Naja nigricollis*, ils possèdent des propriétés neurotoxiques et enzymatiques semblables à celles du venin de *Naja naja* d'Indochine, mais ils se diffèrentent par des caractères antigéniques propres à l'espèce dont ils proviennent. On constate, en effet, une gradation dans l'énergie de leurs affinités pour les anticorps correspondants du sérum hétérologue C, antivenin de *Naja naja*.

Pour traiter efficacement les morsures des serpents d'une région déterminée, il est, par conséquent, indispensable de sélectionner parmi les espèces venimeuses locales celles dont les venins contiennent les antigènes les plus aptes à produire un sérum multivalent doué d'un pouvoir antitoxique élevé.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] E. CESARI et P. BOQUET. Ces *Annales*, 1935, 55, 307 et 1936, 56, 511.  
[2] J. IPSEN. *Bull. Org. Hyg. S. D. N.*, 1938, 7, 848.

## SUR LA RÉCEPTIVITÉ EXPÉRIMENTALE DE LA SOURIS BLANCHE AUX BRUCELLES

par H. JACOTOT et A. VALLÉE.

(Aide-technique : A. LE PRIOL).

*(Institut Pasteur. Service de Microbiologie animale.)*

On sait depuis longtemps que la brucellose est inoculable à la souris blanche mais, malgré les facilités qui s'attachent à l'emploi de ce petit animal, il est rarement utilisé dans l'étude expérimentale de la maladie. Toutefois, il y a une quinzaine d'années, Charlotte H. Singer-Brooks en a fait largement usage dans des essais d'immunisation [1] ; et plus récemment Dishon et Oltizki ont étudié chez la souris les effets des injections intrapéritonéales de brucelles additionnées de mucine [2].

Nous nous sommes proposés de préciser ce que l'on peut attendre dans l'espèce considérée des inoculations intrapéritonéales et des inoculations intraveineuses de matériel brucellique.

Les expériences ont été faites sur des souris blanches femelles de race commune, d'un poids moyen de 20 g.

**I. INOCULATIONS INTRAPÉRITONÉALES.** — Nous présenterons les essais en quatre catégories, selon le matériel microbien mis en œuvre.

a) *Souche vaccinale de Br. abortus bovis, employée sous forme de culture contenant 10 000 000 000 de germes par centimètre cube.* — La dose a été de 0,5 cm<sup>3</sup> de la suspension. Dans quatre essais distincts, 39 souris au total ont été utilisées ; 24 sont mortes de brucellose dont 8 dans les huit premiers jours et 16 entre le neuvième et le trentième jour. Chez la plupart de ces animaux les lésions traduisaient une réaction plus ou moins vive de la rate et du foie, rarement du rein ou du poumon ; dans un cas seulement (souris morte le dix-huitième jour), on a observé un semis d'abcès de la rate.

b) *Souche vaccinale de Br. abortus bovis, employée sous forme de culture contenant 100 000 000 000 de germes par centimètre cube.* — La dose est de 0,25 cm<sup>3</sup> seulement de la suspension. En trois essais on inocule 24 souris : 23 meurent de brucellose dont 15 dans les huit premiers jours et 8 entre le neuvième et le dix-huitième jour. Les lésions ne diffèrent pas de celles des souris qui ont reçu la suspension précédente ; on ne relève pas d'abcès.

c) *Souche pathogène de Br. abortus bovis, employée sous forme de culture contenant 10 000 000 000 de germes par centimètre cube et additionnée de mucine.* — On a inoculé, en un certain nombre d'essais comportant l'emploi de mucines diverses, 46 souris, chaque animal recevant un mélange de 0,5 cm<sup>3</sup> de suspension microbienne et de 0,5 cm<sup>3</sup> de mucine au 1/20 ; 33 souris sont mortes de brucellose dont 24 dans les huit premiers jours et 9 entre le neuvième et le vingt-quatrième jour. Les lésions diffèrent peu de celles qui ont été signalées plus haut ; cependant la péritonite est plus vive (réaction épiploïque intense, dépôts fibrineux à la

surface des viscères) ; sur deux animaux morts après sept et huit jours, on relève de nombreux petits abcès du foie.

d) *Même souche pathogène de Br. abortus bovis, employée sous forme de pus ou de broyat de parenchyme rénal criblé d'abcès punctiformes et additionnés de mucine.* — Chaque souris reçoit 0,25 cm<sup>3</sup> de pus ou de broyat dilué au 1/20, mélangé à 0,50 cm<sup>3</sup> de mucine au 1/20. Trois essais ont été faits portant sur un ensemble de 12 souris ; toutes sont mortes de brucellose entre le deuxième et le onzième jour. Les réactions péritonéales, spléniques et hépatiques sont particulièrement intenses ; on relève des abcès chez tous les animaux morts après le septième jour. Voici l'essentiel de quelques-uns des tableaux nécropsiques :

*Souris ayant reçu pus + mucine.* — Morte le dixième jour : nombreux abcès sur le foie ; abcès de la rate ; abcès des ovaires.

Morte le onzième jour : abcès confluents du foie ; abcès entre le foie et la rate ; adhérence de la rate à la paroi abdominale.

*Souris ayant reçu broyat rénal + mucine.* — Morte le septième jour : vaste collection purulente entre l'estomac et la rate et qui englobe celle-ci ; nombreux abcès du lobe droit du foie ; abcès du rein gauche ; abcès péritonéaux ; quelques foyers punctiformes de pneumonie.

Morte le septième jour : une fausse membrane purulente enrobe le foie et la rate ; nombreux abcès du rein ; ovaires violenement congestionnés.

## II. INOCULATIONS INTRAVEINEUSES.

— Les essais ont porté sur deux souches, l'une vaccinale, l'autre pathogène, en cultures et sans addition de mucine.

a) *Souche vaccinale.* — En deux expériences 18 souris ont reçu par inoculation dans la veine de la queue 0,20 cm<sup>3</sup> d'une suspension de culture sur gélose ; 12 sont mortes du deuxième au quarantième jour avec lésions inflammatoires ou de dégénérescence des parenchymes. Les six survivantes ont été sacrifiées ultérieurement ; leurs ensemencements ont été positifs.

b) *Souche pathogène.* — En deux expériences 15 souris ont reçu par la même voie, 0,20 cm<sup>3</sup> d'une suspension de culture sur gélose ; les 5 souris de l'une de ces expériences ont résisté à l'inoculation ; trente-cinq jours après on les a sacrifiées, toutes présentaient splénomégalie et hépatomégalie et 2 portaient des abcès du foie ; parmi les 10 souris de l'autre expérience, 9 sont mortes entre le deuxième et le vingt-neuvième jour avec lésions inflammatoires ou dégénératives habituelles ; la survivante a été sacrifiée ultérieurement ; ses ensemencements ont été positifs.

A titre comparatif, 30 souris avaient reçu la même quantité de suspension microbienne dans le péritoine ; 27 sont mortes, également réparties dans les deux expériences entre les premier et vingtième jours d'une part, les deuxième et cinquantième jours d'autre part, avec les mêmes lésions ; les 3 survivantes ont été sacrifiées ultérieurement et ont donné des ensemencements positifs.

**CONCLUSION.** — L'inoculation de *Br. abortus bovis* par la voie péritonéale a, chez la souris blanche, des conséquences variables selon divers facteurs.

Dans nos essais, une souche vaccinale a tué 50 p. 100 des souris qui ont reçu 5 milliards de germes et 95 p. 100 de celles qui ont reçu 25 milliards de germes. Les lésions des parenchymes, de type inflammatoire ou dégénératif n'ont abouti à l'abcédaton que chez les sujets qui ont résisté deux ou trois semaines à l'infection.

Une souche pathogène inoculée à la dose de 5 milliards de germes

avec addition de mucine a tué 72 p. 100 des animaux. La réaction péritonéale était alors plus forte et la formation d'abcès viscéraux plus rapide mais non plus fréquente qu'après injection de brucelles vaccinales.

L'épreuve la plus sévère a été l'inoculation de pus brucellique ou de broyat de rein lésé, additionnés de mucine ; mortelle dans tous les cas, elle a éveillé des réactions péritonéales, spléniques et hépatiques intenses et provoqué la formation d'abcès multiples plus ou moins volumineux chez la plupart des souris qui ne sont pas mortes dans les tout premiers jours.

Il n'apparaît pas que la voie veineuse soit, chez la souris, plus sévère que la voie péritonéale ; il arrive qu'on observe le contraire : 3 souris sur 8 ont ainsi résisté à l'inoculation de 25 000 000 000 de germes de la souche vaccinale et, d'autre part, tout un groupe de 5 souris a résisté à l'inoculation de 2 500 000 000 de germes d'une souche pathogène qui, à la même dose, tuait 18 souris sur 20 inoculées par voie péritonéale. Il ne semble pas non plus que l'introduction des brucelles dans le torrent circulatoire favorise la formation de granulomes ou d'abcès dans les parenchymes.

#### BIBLIOGRAPHIE

[1] CHARLOTTE H. SINGER-BROOKS. *J. Infect. Dis.*, 1937, **60**, 265.

[2] T. DISHON et L. OLITZKI. *Proceed. Soc. exp. Biol. Med.*, 1949, **74**, 698.

### LES GROUPES SANGUINS DES ÉQUIDES

#### III. — LES GROUPES SANGUINS DES ÂNES

par M<sup>me</sup> L. PODLIACHOUK et A. EYQUEM.

(Institut Pasteur. Laboratoire d'Hématologie et des Groupes sanguins.)  
(Service R. Dujarric de la Rivière.)

Nous avons signalé, antérieurement, qu'en examinant l'action des sérum de mulet sur les globules rouges de mulet à l'aide de la réaction d'agglutination, nous avions pu mettre en évidence 4 antigènes érythrocytaires : A, B, C, D. L'examen des sérum absorbés a permis de reconnaître que les antigènes A, C, D, appartenaient à l'espèce chevaline, alors que l'antigène B ne pouvait être reconnu sur les globules rouges des chevaux.

L'examen ultérieur de plus de 250 chevaux a permis de reconnaître par la réaction d'agglutination, en examinant des iso-sérum absorbés, l'existence de deux autres antigènes E et F. On peut, de la même manière, reconnaître ces antigènes sur les globules rouges de mulet.

A l'aide des anticorps provenant des sérum de mullets, et dans ce cas, ne contenant pas l'agglutinine hétéro-spécifique anti-âne, et à l'aide des anticorps provenant des sérum de chevaux et débarrassés

par absorption des agglutinines hétéro-spécifiques anti-âne, il a été possible d'effectuer l'étude des antigènes érythrocytaires des ânes.

Notre première étude a porté sur 47 ânes, dont 40 provenant d'un élevage nord-africain, appartenant aux races catalane, pyrénéenne et poitevine. Deux autres ânes sont probablement de race catalane et 5 baudets appartiennent à la race poitevine et comptent parmi les reproducteurs accouplés avec les juments mulassières de la région de Niort.

Il a été possible de mettre en évidence chez 35 ânes sur les 47 examinés l'antigène érythrocytaire B individualisé chez des mullets. Cet antigène présente le même caractère sérologique chez tous les animaux examinés, il n'y a pas de différence d'agglutinabilité notable entre les globules rouges de ces différents animaux lorsqu'ils sont mis en contact avec l'agglutinine anti-B. Chez 12 ânes, l'antigène n'a pas été mis en évidence ; de plus, nous n'avons pas constaté la présence soit sous forme évidente, soit sous forme masquée décelable par absorption, des antigènes A, C, D, E, F individualisés chez le mullet ou chez le cheval. Nous avons donc considéré que ces 12 animaux appartaient à un groupe provisoirement dénommé O.

Nous avons pu avoir une première indication sur la transmission héréditaire de l'antigène B en examinant 17 familles d'ânes.

Nous avons pu constater que :

12 croisements	B × B	donnaient	10 B	et 2 du groupe O.
6	—	B × O	—	3 B et 1 — O.
1	—	O × O	—	1 — O.

La transmission héréditaire de l'antigène B se fait suivant la loi de Mendel, la présence de l'antigène B étant dominante sur son absence. Les individus ayant le phénotype B peuvent être homozygotes ou hétérozygotes, comme le montre le croisement d'un mâle « Gérone » du groupe B avec trois femelles différentes.

Avec 2 de ces ânesses appartenant au groupe B, on a obtenu 2 ânons du groupe O et avec une troisième ânesse du groupe O on a aussi obtenu un ânon du groupe O. On en conclut donc que le génotype de « Gérone » est BO.

La répartition de cet antigène suivant les races montre une fréquence élevée de l'antigène B dans la race poitevine et, au contraire, une faible fréquence dans la race catalane, alors que la race pyrénéenne possède des caractères intermédiaires. On peut supposer que les individus de race pure catalane sont du groupe OO, alors que ceux de race poitevine seraient BB et ceux des races pyrénéennes BO.

L'examen des hémagglutinines existant dans le sérum d'âne nous a permis de reconnaître les anticorps décelant les agglutinogènes A, C, D, E après avoir réalisé une absorption de l'agglutinine hétéro-spécifique à l'aide de globules rouges d'un cheval du groupe O.

Nous avons noté que cette hétéro-agglutinine présente un titre plus élevé vis-à-vis des globules rouges de cheval que vis-à-vis des globules rouges de mullet. Ainsi, 26 ânes ont une agglutinine anti-mulet d'un titre inférieur à 1/2, alors que 22 ânes ont une agglutinine anti-cheval dont le titre est compris entre 1/8 et 1/256.

Nous n'avons pas pu mettre en évidence d'iso-agglutinines naturelles actives sur les globules rouges des 47 ânes examinés. En parti-

culier il n'existe pas dans le sérum des ânes examinés d'agglutinine anti-B active vis-à-vis de l'antigène érythrocytaire B du mulet ou de l'âne.

L'agglutinine anti-A avait été mise en évidence chez 37 ânes sur 40 et présente la même activité et le même titre vis-à-vis des globules rouges de mulet ou vis-à-vis des globules rouges de chevaux.

L'agglutinine anti-C existait dans le sérum de 12 ânes sur 40 et présentait la même activité vis-à-vis des globules rouges de mulet ou de chevaux.

L'agglutinine anti-D est un peu plus active sur les globules rouges de chevaux, en particulier lorsque ceux-ci sont considérés comme homozygotes du point de vue de l'antigène D. Chez 40 ânes le titre de cette agglutinine anti-D était compris entre 1/2 et 1/64 lorsqu'on examinait son action vis-à-vis de globules rouges de chevaux. Au contraire, on ne pouvait la mettre en évidence que dans 29 sérum lorsqu'on la recherchait à l'aide de globules rouges de mulet.

L'agglutinine anti-E a été décelée à un faible titre chez 18 ânes sur 40.

Nous n'avons pas constaté de transmission héréditaire de la propriété d'élaborer des hémagglutinines de taux élevé.

Dans le but d'étudier les propriétés des immunserums préparés chez l'âne, nous avons immunisé une ânesse possédant une agglutinine anti-D titrant 1/16 et une faible agglutinine anti-A à l'aide de globules rouges de cheval porteurs de l'antigène D. Cette immunisation a permis d'obtenir un sérum contenant une agglutinine hétéro-spécifique titrant 1/10 000 et une agglutinine anti-D titrant 1/64. Un mois après l'arrêt de l'immunisation, le titre de l'agglutinine hétéro-spécifique atteignait 1/1 000.

En tenant compte du fait que l'immunisation de la jument mulassière se fait non seulement vis-à-vis de l'antigène caractéristique de l'espèce asine mais aussi vis-à-vis de l'antigène B, nous pensons qu'il est peut-être intéressant d'étudier le croisement de juments de certains groupes sanguins avec des ânes du groupe O. Les baudets reproducteurs de la région de Niort, que nous avons pu examiner, appartiennent tous au groupe B. On sait que la maladie hémolytique du muleton se rencontre avec une fréquence plus faible depuis qu'on a substitué aux juments originelles des reproductrices provenant de la race bretonne. Il est donc légitime de poursuivre l'étude des incompatibilités sérologiques entre ces deux espèces.

#### BIBLIOGRAPHIE

- A. EYQUEM et L. PODLIACHOUK. Ces *Annales*, 1952, **83**, 56.  
L. PODLIACHOUK et A. EYQUEM. Ces *Annales*, 1952, **83**, 405.

Nous tenons à remercier très sincèrement M<sup>me</sup> Cordier, directeur de l'Institut Arloing à Tunis, le Dr vét. Dodier et MM. Abela et Boris du Service de Production animale et du Ministère de l'Agriculture de Tunisie (Elevage de Sidi-Tabet), qui ont bien voulu nous faire parvenir les prélèvements d'un certain nombre d'animaux, ainsi que le Dr vét. Saint-Martin, de Niort.

Ce travail a été effectué en partie avec l'aide de l'Institut national d'Hygiène.

## BACTÉRIOPHAGIE DU BACILLE TYPHIQUE PAR QUELQUES PHAGES VI OBSERVÉE AU MICROSCOPE ÉLECTRONIQUE

par E. EDLINGER et J. GIUNTINI.

(Institut Pasteur. Service du Bactériophage et Service des Virus.)

Après avoir étudié au microscope électronique la morphologie des bactériophages Vi I, II et IV de Craigie et Brandon, 1936 [1], et de Craigie et Yen, 1937 [2, 3, 4] (J. Giuntini, E. Edlinger et P. Nicolle, 1953 [5]), nous avons observé par le même procédé les différentes phases de la bactériophagie, c'est-à-dire la succession des phénomènes qui résultent de la fixation du phage sur la cellule bactérienne et qui aboutit à la lyse de la bactérie et à la multiplication des corpuscules.

Nous avons utilisé la même souche de *S. typhi*, type A, les mêmes bactériophages Vi I, II et IV et également le même milieu (eau peptonée à 0,3 p. 100 additionnée de 0,3 p. 100 de glucose et de 0,04 p. 100 de chlorure de calcium) (1).

Dans ces conditions, des cultures bactériennes ayant reçu  $1.10^6$  particules par centimètre cube de l'un des trois phages en question et placées pendant quatre heures à 37°, subissent la lyse bactériophagique, dont on suit l'évolution par des mesures répétées de la turbidité au photocalorimètre Jouan (écran vert, longueur d'onde 520-550 mμ).

Dans la même figure, nous avons indiqué également l'augmentation des « centres infectieux ». Le titrage de ces « centres infectieux » (corpuscules bactériophages libres + bactéries contaminées) a été effectué sur des prélèvements d'échantillons de  $0,1 \text{ cm}^3$  dilués à  $10^{-4}$  immédiatement dans de l'eau glacée. Nous avons pratiqué ensuite la méthode de titrage dite « à la goutte ».

Dans les conditions de nos expériences, le phage I ne provoque qu'un arrêt de l'augmentation de la densité optique, tandis que le phage II et surtout le phage IV éclaircissent la culture, sans toutefois la rendre complètement limpide.

L'augmentation des centres infectieux dans la culture par l'addition du phage I est plus faible que pour les deux autres phages ; c'est le phage Vi II qui montre le pouvoir de multiplication le plus élevé.

Les préparations au microscope électronique ont été obtenues de la manière suivante : des lysats bactériophagiques préalablement filtrés sur bougie Chambéland L<sub>3</sub> et titrés (phage Vi I =  $3.10^9$ , phage Vi II =  $7.2.10^9$  et phage Vi IV =  $3.2.10^9$  corpuscules par centimètre cube) sont laissés en contact avec des cultures du bacille typhique Vi en pleine croissance contenant environ  $10^8$  germes par centimètre cube, à la température de 37° C, pendant des temps variant entre dix et trente minutes. Ensuite ce mélange est dilué à 1/100 dans de l'eau

(1) Certaines manipulations techniques ont été effectuées avec l'aide de M. G. Brault.

glacée et gardé au réfrigérateur jusqu'à la préparation des porte-objets.

Une microgoutte est déposée sur une ou plusieurs grilles métalliques soumise durant cinq minutes au rayonnement d'une lampe de quartz à vapeur de mercure, afin de la stériliser, puis une partie du liquide de la goutte est enlevée, la dessiccation complète s'effectuant alors très rapidement sous l'arc à mercure.

L'ombrage métallique a été réalisé sur les porte-objets avant

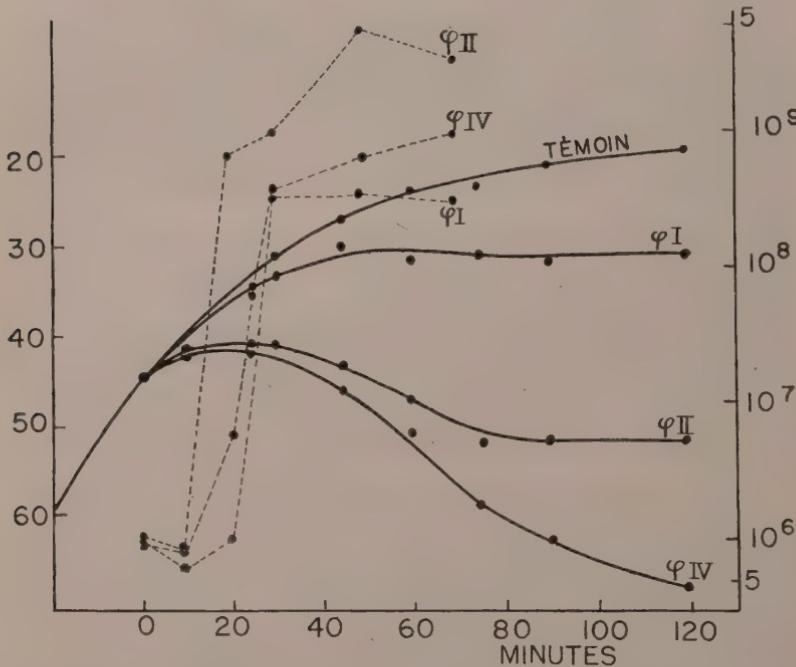


FIG. 1. — Bactériophagie de *S. typhi* par les phages Vi I, II et IV.

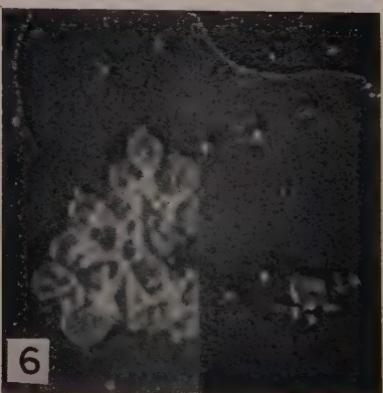
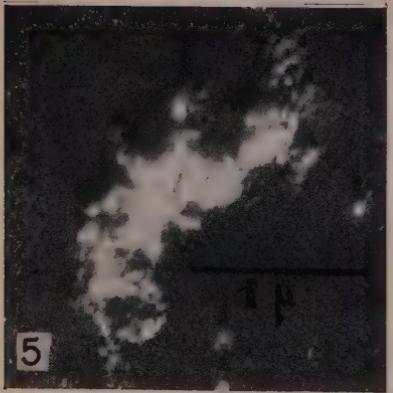
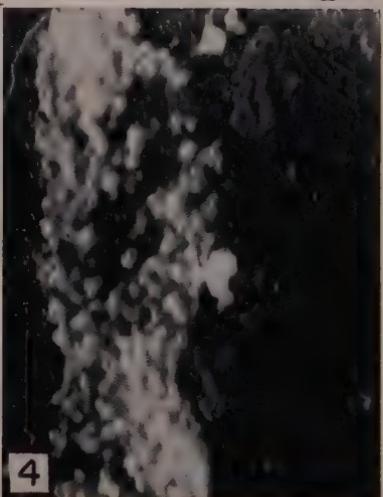
A droite échelle de densité optique exprimée en degré du photocolorimètre (écran vert). A gauche échelle logarithmique du nombre des bactériophages. Courbes en plein : cultures bactériennes. Courbes discontinues : multiplication des bactériophages.

l'examen par évaporation sous vide d'or palladium sous un angle d'environ 15°.

Le microscope électronique utilisé était un appareil Siemens à lentilles électromagnétiques (accélération des électrons 80 000 volts).

**DISCUSSION DES RÉSULTATS.** — D'après nos observations, dont on trouvera quelques exemples sur la planche I, la fixation des phages provoque une modification des contours de la cellule bactérienne qui prennent un aspect diffus.





Comme ces phages sont spécifiques de l'antigène Vi et que nous savons que cet antigène de surface est assez labile, on pourrait émettre l'hypothèse qu'il s'agit d'une destruction de la paroi cellulaire contenant l'antigène Vi sous l'influence du phage Vi.

Ensuite la bactérie semble se gonfler.

Le stade suivant que nous avons observé est une fragmentation du corps bactérien jusqu'alors uniformément dense en de nombreuses formations globulaires de dimensions homogènes, plus grandes ou quelquefois égales, aux têtes des bactériophages. La membrane éclate ou disparaît, mais les cils détachés de la bactérie restent visibles.

Après la lyse complète, les cils restent inchangés. On observe à l'une de leurs extrémités des formes rondes qui semblent être les points d'attache des cils à l'intérieur de la cellule bactérienne, ce qui les assimilerait aux blépharoblastes des protozoaires. En outre, il subsiste de nombreux débris bactériens informes qui influencent certainement les mesures photométriques de la lyse bactérienne (turbidité résiduelle).

**CONCLUSIONS ET RÉSUMÉ.** — Nos observations de la bactériophagie du bacille typhique sont analogues à celles qui ont été publiées avec les phages coli-dysentériques sur *E. coli* B par Wyckoff [6, 7, 8, 9] et par Hercik [10, 11].

De plus, les cils qui ne sont pas touchés par la lyse gardent une attache assez comparable aux blépharoblastes des flagellés des protozoaires. Cette attache n'est pas attaquée par les phages et peut être ainsi mise en évidence par la lyse bactérienne.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. CRAIGIE et K. F. BRANDON. *J. Path. Bact.*, 1936, **43**, 233 et 249.
- [2] J. CRAIGIE et C. H. YEN. *Transact. Roy. Soc. Canada*, 1937, **5**, 49.
- [3] J. CRAIGIE et C. H. YEN. *Canada publ. Hlth. J.*, 1938, **29**, 448.
- [4] J. CRAIGIE et C. H. YEN. *Canada publ. Hlth. J.*, 1938, **29**, 484.
- [5] J. GIUNTINI, E. EDLINGER et P. NICOLLE. *Ces Annales*, 1953, **84**, 787.
- [6] R. W. G. WYCKOFF. *Bioch. et Biophys. Acta*, 1948, **2**, 27.
- [7] R. W. G. WYCKOFF. *Bioch. et Biophys. Acta*, 1948, **2**, 246.
- [8] R. W. G. WYCKOFF. *Proceed. Soc. exp. Biol. Med.*, 1949, **71**, 144.
- [9] R. W. G. WYCKOFF. *Nature*, 1950, **162**, 649.
- [10] F. HERCIK. *Experientia*, 1950, **6**, 64.
- [11] F. HERCIK. *Casop. Lek. Cesk.*, 1950, **89**, 91.

#### LÉGENDE DE LA PLANCHE

FIG. 1. — *S. typhi* et phage Vi IV. Deux bactéries ayant fixé de nombreux phages. La bactérie de gauche possède des contours nets. La bactérie qui se trouve au centre montre une zone diffuse sur les bords. Les phages sont fixés dans cette zone diffuse.

FIG. 2. — *S. typhi* et phage Vi IV. Plusieurs corps bactériens ont fixé de nombreux phages.

FIG. 3. — *S. typhi* et Phage Vi II. Le corps bactérien anormalement grand, mais intact, est entouré de nombreux phages assez profondément fixés sur son pourtour. Les cils ne semblent pas être modifiés.

FIG. 4. — *S. typhi* et phage Vi I. Dans le corps bactérien sensiblement gonflé, on voit des corps globulaires de taille égale, mais sensiblement plus grands que les corpuscules bactériophages. La membrane apparaît parfois déchirée. On observe également une partie d'un cil intact.

FIG. 5. — *S. typhi* et phage Vi II. Le corps bactérien est constitué par des corps globulaires correspondant à la taille des phages et on ne voit ni membrane, ni cils. Autour de la bactérie, quelques phages libres.

FIG. 6. — *S. typhi* et phage Vi II. Lyse complète. A côté des phages libres, on observe des cils intacts avec leur attache ronde.

## RECHERCHES SUR L'AUTOLYSE DE LA PARTIE HYDROSOLUBLE DES HOMOGÉNATS DE FOIE

par RAYMOND ALLOUF et MICHEL MACHEBOËUF.

*(Institut Pasteur.)*

Nous avons étudié l'autolyse en prenant comme matière première le liquide limpide obtenu en éliminant par centrifugation rapide les éléments non hydrosolubles d'homogénats de foie. Nous cherchions à étudier l'autolyse en l'absence de tout élément figuré pouvant se sédimerter sous l'influence d'un champ de gravitation centrifuge de l'ordre de 30 000 g pendant deux heures. Afin d'éviter l'action éventuelle de microorganismes, nous avons opéré tantôt en présence d'un antiseptique ou d'un bactériostatique et tantôt dans des conditions d'asepsie rigoureuse avec filtration sur filtre bactériologique.

**PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL.** — Un lapin est assommé puis saigné par section de la carotide. On perfuse aussitôt le foie pendant sept minutes au moyen d'une solution saline isotonique (NaCl 8,5 g par litre). On détache ensuite le foie en éliminant sa vésicule biliaire ; on le transporte dans une chambre froide ( $-5^{\circ}$  C) où on le broie dans un « waring-blendor », pendant trois minutes, au sein de la solution saline précédente, à raison de 10 ml pour 1 g de foie. L'homogénat est soumis, pendant deux heures, à la centrifugation (20 000 tours-minute, soit 30 000 g à la température de  $-5^{\circ}$  C). Le surnageant limpide est notre matériel d'étude ; on le répartit en échantillons identiques dans une série de tubes que l'on scelle sous vide, puis on les maintient à la température de  $37^{\circ}$  C. Dans ces conditions, ces liquides ne sont pas aseptiques et l'on doit craindre une prolifération microbienne ; mais dès la troisième heure, alors que le développement bactérien est encore infime, l'autolyse a évolué de façon sensible et l'on observe qu'un précipité est rassemblé au fond du tube.

**EMPLOI D'UN ANTISEPTIQUE : LE CHLOROFORME.** — L'antiseptique est ajouté dans chaque tube à raison de 0,1 ml pour 5 ml d'extrait ; mais on se garde d'agiter afin d'éviter la dénaturation des protéines par

étalement aux interfaces dans une émulsion. Dans certaines expériences, nous avons vérifié que la quantité de chloroforme strictement nécessaire pour saturer l'eau, sans excès, est suffisante pour qu'évoluent les phénomènes que nous allons décrire.

Il apparaît en quelques minutes un louche qui augmente progressivement, puis se rassemble en un précipité (en une ou deux heures) qui s'accroît encore beaucoup pendant les heures qui suivent.

L'étude pondérale du précipité a montré qu'après la vingtième heure, il s'accroît encore pendant au moins quatre jours, mais très lentement.

Simultanément, avec cette précipitation, s'effectue la libération d'azote aminé titrable par la technique au formol de Sørensen. Cette libération est, elle aussi, rapide pendant une vingtaine d'heures, puis très lente et même insensible ensuite.

Nous avons étudié les aminoacides et les peptides dialysables. Nous avons noté, dès les premières heures de l'autolyse, la présence à l'état libre de la plupart des aminoacides et de quelques peptides dialysables. Les rapports quantitatifs entre les divers aminoacides libres (séparés par la microchromatographie sur papier) ne varient pas sensiblement par la suite (sauf en ce qui concerne l'acide glutamique), mais leurs masses totales augmentent progressivement.

Le précipité qui apparaît n'est pas le fait d'une variation de pH pendant l'autolyse, car le pH reste bien constant ( $6,6 \pm 0,1$ ). Il s'agit d'un précipité assez riche en azote (13 p. 100) et fournissant par hydrolyse la plupart des aminoacides. Un précipité semblable est apparu lorsque nous avons utilisé comme antiseptique le toluène au lieu du chloroforme.

**Sous conditions d'asepsie après filtration sur bougie de Chamberland.** — Les expériences effectuées aseptiquement après filtration sur bougie en faïence ont montré que le précipité apparaissait, là aussi, mais beaucoup moins abondant. Les filtres en faïence retenaient une forte proportion de l'activité protéolytique (variable suivant les conditions de filtration). Nous considérons donc ces expériences simplement comme une preuve de la formation du précipité en l'absence de chloroforme.

**EMPLOI D'UN ANTIBIOTIQUE.** — Des essais effectués en utilisant comme bactériostatique de la dihydrostreptomycine ont montré que le précipité apparaissait là aussi, mais moins abondant que dans le cas du chloroforme. La différence avec le chloroforme porte également sur la vitesse de libération des aminoacides. La vitesse initiale est alors aussi rapide qu'en l'absence de tout antiseptique et de tout traitement préalable du liquide étudié.

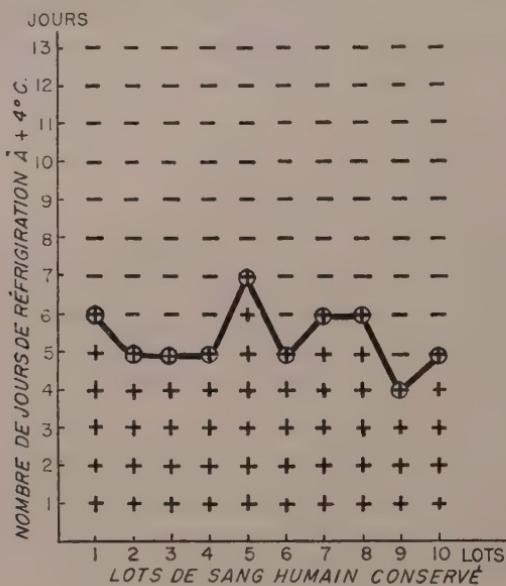
**RÉSUMÉ.** — La partie de l'homogénat de foie qui, après centrifugation énergique, reste en solution limpide dans de l'eau salée isotonique se trouble progressivement et forme un abondant précipité, même en l'absence de toute action microbienne. Le chloroforme ou le toluène utilisés comme antiseptiques provoquent une précipitation beaucoup plus abondante. La précipitation évolue simultanément avec la libération de l'azote aminé par protéolyse. Nous avons étudié les aminoacides et les peptides dialysables libérés.

**SURVIE DE *BORRELIA PERSICA* DSCHUNKOWSKI 1912,  
DANS LE SANG TOTAL HUMAIN CONSERVÉ A +4° C**

par M. BOURGAIN, L. MOLLARET et J. CHAMBRY.

(*Laboratoire de la Marine en Tunisie, Sidi-Abdallah.*)

Une opinion courante en matière de sang humain conservé veut qu'une réfrigération de quarante-huit heures entre + 4° et + 6° du sang total supprime le danger d'une contamination syphilitique. En



Résultats des inoculations au cobaye.

serait-il de même en cas de sang infesté par certains spirochètes récurrents ?

L'un de nous a déjà montré en 1945 [1] que *Borrelia persica* (souche iranienne) survit sous sa forme type sanguicole pendant au moins dix-neuf jours à + 4° dans les organes réfrigérés d'animaux d'épreuve infestés expérimentalement.

La température de + 4° semble favorable à la survie spirochétique, alors que ce même spirochète ne peut résister plus de quatre jours à + 37° en mêmes organes infestés. Ces faits expérimentaux autorisèrent l'hypothèse qu'en sang total conservé à + 4° *Borrelia persica* (Dschunkowski 1912) devait survivre.

**ETUDE EXPÉRIMENTALE.** — Les recherches commencées en 1945 ne furent reprises qu'en 1952.

La technique expérimentale fut la même pour tous les lots de sang conservé, à savoir : l'infestation au moment de la récolte sanguine de  $300 \text{ cm}^3$  de sang total humain ( $300 \text{ cm}^3$  de sang frais dans  $200 \text{ cm}^3$  de solution anticoagulante) par  $1 \text{ cm}^3$  de sang de cobaye infesté expérimentalement par *Borrelia persica*. Le sang du cobaye est récolté par ponction du cœur au moment où l'animal est en phase de pullulation spirochétienne sanguine. Après brassage, ce sang total infesté est placé au frigidaire à une température constante de  $+ 4^\circ$ . Chaque jour, après brassage,  $1 \text{ cm}^3$  de sang conservé infesté est inoculé par voie sous-cutanée à des cobayes neufs. Dès le quatrième jour de l'inoculation d'épreuve, le sang animal est contrôlé journallement en gouttes épaisses colorées au Giemsa.

*Dix lots de sang total ont été soumis à l'expérience.*

**RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.** — *Interprétation du graphique.* — 1<sup>o</sup> La survie de *Borrelia persica* Dschunkowski 1912, en sang total humain conservé à  $+ 4^\circ$  est constante pendant au moins quatre jours. Elle peut se poursuivre parfois jusqu'au septième jour.

2<sup>o</sup> La durée de la survie spirochétique avec *conservation du pouvoir infestant* a été :

a) Pour la totalité des lots de sang total. . . . .	4	jours.
b) Pour 90 p. 100 des lots . . . . .	5	—
c) Pour 40 p. 100 . . . . .	6	—
d) Pour 10 p. 100 . . . . .	7	—

**CONSIDÉRATIONS.** — 1<sup>o</sup> La multiplication spirochétique n'a jamais été observée. Ce fait concorde avec les observations faites sur organes réfrigérés d'animaux d'épreuve.

2<sup>o</sup> La survie spirochétique à  $+ 4^\circ$  en sang total humain est de courte durée par rapport à celle que l'on observe en organes réfrigérés d'animaux d'épreuve. Cette anomalie encore inexpliquée serait peut-être liée à une *action anti* de la substance anticoagulante nécessaire à la préparation du sang total. Sans parler de la possibilité de l'apparition d'immobilisines *in vitro*, l'action spirochéticide du sérum humain peut être envisagée.

3<sup>o</sup> Les inoculations d'épreuve positives ont toujours donné des spirochétémies peu riches en spirochètes, alors qu'en général *Borrelia persica* provoque chez le cobaye une pullulation spirochétique sanguine.

**CONCLUSION.** — La survie de *Borrelia persica* en sang total humain conservé à  $+ 4^\circ$  est d'au moins quatre jours. Elle peut se poursuivre jusqu'au septième jour de la réfrigération.

*La réfrigération à  $+ 4^\circ$  n'est pas une garantie contre l'infestation récurrentielle par ce spirochète.*

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] M. BOURGAIN. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1946, **39**, 185.
- [2] M. BOURGAIN. *Ces Annales*, 1947, **73**, 84.

**RUBROBACTERIOPSIS RUGOSA NOV. GEN. NOV. SP.****I. — DESCRIPTION MORPHOLOGIQUE**

par PHILIPPE-JACQUES LUTERAAN et JANINE MÉRY.

**INTRODUCTION.** — *Bactérie ou champignon?* Telle est la question qui s'est posée à l'examen d'un microorganisme pigmenté et saprophyte dont l'aspect morphologique et le mode de croissance paraissent tout d'abord être ceux d'une bactérie. La délimitation entre bactéries et champignons est-elle absolue? La même question se pose à propos d'un autre type d'organismes pigmentés, les *Nocardia* qui, soit du fait de l'évolution, soit plus simplement en raison de caractères de convergence, se révèlent intermédiaires entre les *Mycobacteriaceae* d'une part, les *Streptomycetaceae*, champignons authentiques, d'autre part. Ici l'organisme est d'un type tout à fait différent et il a été nécessaire de compléter l'étude morphologique par celle de caractères biochimiques pour établir sa taxonomie.

**ECOLOGIE.** — Isolé, une unique fois, comme saprophyte, de la surface de l'enveloppe d'un fruit, le développement s'est accompli d'emblée sous la forme qui sera décrite et qui s'est maintenue sans changement depuis presque deux ans.

L'organisme a d'abord été classé comme bactérie rouge avec d'autres également isolés comme organismes aériens et saprophytes, à pigment similaire persistant; mais celui-ci oppose sa grande taille et sa forme sphéroïdale aux autres plus petits et correspondant à des types morphologiques très variés: bacilles mobiles, bâtonnets, sarcines, type *Nocardia*, etc.

**DESCRIPTION MORPHOLOGIQUE.** — 1<sup>o</sup> *Aspect macroscopique.* — Pour obtenir une croissance convenable, un ensemble de caractères macroscopiques riches en détails intéressants, une pigmentation intense avec les organismes cités ci-dessus, il faut employer des milieux sucrés. Un milieu de choix est la gélose incliné type Sabouraud; en l'occurrence, une augmentation de la concentration en sucre jusqu'à 7,5 p. 100 révèle encore plus distinctement les différences d'aspect et de pigmentation chez ces organismes ensemencés simultanément et identiquement, puis cultivés à 28°, dans la zone de température optima.

La colonie est d'abord hémisphérique, rose orangé, brillante, lisse, avec quelques plis radiés larges, mais jamais ni muqueuse, ni coulante. Rapidement, sa surface devient membraneuse par les plis surélevés qui se forment. La croissance s'effectue autant en épaisseur qu'en largeur; la colonie adhère à la surface de la gélose, mais n'a aucune tendance à une extension en profondeur dans le sein de celle-ci.

L'aspect final est le suivant: colonie surélevée, membraneuse à plis courbes surélevés, vermiculés, se recouvrant et se coupant en tous sens. Les plis, de dimensions constantes, sont constitués par deux bords saillants, surélevés, constamment parallèles, délimitant une gorge ou sinuosité de profondeur égale sur toute sa longueur.

La colonie est orange, couleur carotte. La pigmentation est intense. Elle persiste sans changement pendant trois ou quatre mois et, lorsque, plus tard, il y a décoloration, celle-ci est lente et s'arrête à une teinte intermédiaire jaune bistre. La pigmentation est égale en surface et en profondeur, et ceci dès le début ; on présume que le pigment est lié d'une façon particulièrement forte à des constituants cellulaires et que, pour cette raison, il est protégé de cette destruction banale et rapide en présence d'air observée chez les levures rouges.

Au prélèvement, la colonie membraneuse vient en fragments difficilement délitescents.

En milieu liquide, la production d'un voile pigmenté est constante et semi-précoce au quatrième ou cinquième jour, précédée de la for-

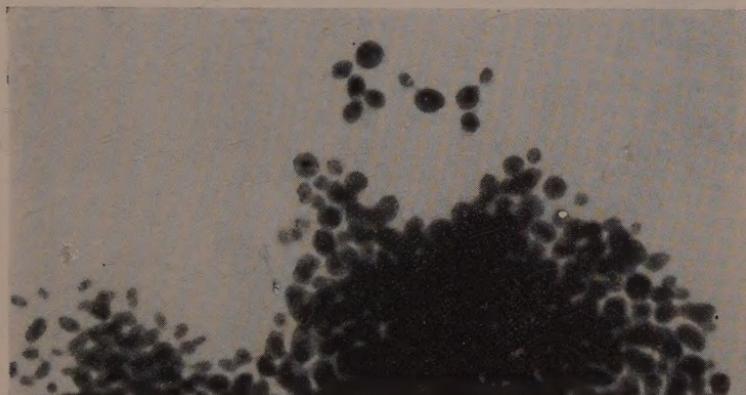


FIG. 4.

mation d'un anneau bas et adhérent. Il est lisse et tombe en fragments à la moindre secousse, mais ne tarde pas à se reproduire. A la longue, il y a diffusion dans le sein du milieu liquide d'un pigment jaune, ce qui est banal avec tous les organismes ayant ce type de pigmentation.

**2<sup>o</sup> Morphologie microscopique.** — Chaque élément cellulaire a la forme d'un sphéroïde un peu allongé, mesurant 3  $\mu$  de petit axe, 3-4  $\mu$  de grand axe. Le corps cellulaire est épais ; l'examen microscopique de chaque partie de la cellule nécessite une nouvelle mise au point micrométrique à l'immersion ; la coloration par les colorants acides (écarlate de Biebrich, etc.), qui laisse habituellement aux corps cellulaires une certaine transparence, ne permet plus d'obtenir cet effet (fig. 1 et 2). L'épaisseur cellulaire et la forme sphéroïdale allongée s'opposent à la forme ellipsoïdale aplatie observée chez les *Rhodotorula*.

Les cellules sont liées entre elles par deux, trois et davantage, non point en chaînettes, mais en structure superposée. En faisant varier la mise au point micrométrique lors de l'examen microscopique de frottis ou de cultures sur lame, un ensemble de cellules se présente

successivement sous les aspects 1, 2, 3, figurés sur nos dessins (fig. 3). Les éléments donnent l'apparence de dériver les uns des autres selon un processus de scissiparité par clivage transversal et asymétrique.

En fait, il semble qu'il n'y ait pas scissiparité, mais uniquement bourgeonnement suivant une modalité souvent particulière. Son siège peut se situer en n'importe quel point de la surface cellulaire ; c'est-à-dire qu'il peut être aussi bien apical ou subapical comme chez les *Rhodotorula* que superficiel, profond, latéral (figures). Unique, le bourgeon s'isole rapidement, sous forme de globule sphérique tout



FIG. 2.

en restant lié à la cellule mère par la séquelle, colorable au bleu coton ou au bleu de méthyle, de la communication primitive. Ce lien se raccourcit et s'élargit à mesure que le bourgeon s'accroît ; souvent la cellule mère continue sa croissance après bourgeonnement ; il arrive que les cellules sont de plus en plus resserrées l'une contre l'autre et se recouvrent en débordant l'une sur l'autre ; en cas de bourgeonnement sur l'une des faces, les cellules se recouvrent d'emblée (V. figures) ; l'aspect de clivage transversal et asymétrique s'explique par cette multiplication et cette croissance en épaisseur.

Des dispositions réciproques très variées peuvent donc être prises par les éléments cellulaires ; mais il n'y a aucune manifestation patente du phénomène appelé croissance centrifuge et périphérique ; il n'y a pas de migration du cytoplasme à l'extrémité distale des éléments cellulaires ; les cellules ne s'allongent pas suivant un axe de croissance centrifuge et à la périphérie dans les cultures en couche

mince qui favorisent généralement ce processus ; *a fortiori*, il n'y a jamais formation d'éléments pseudo-mycéliens (V. fig.).

Cependant, s'il n'y a pas allongement, le facteur élongation exerce son action d'une façon particulière sur les éléments sphéroïdaux ; dans les zones les plus rapidement déshydratées des cultures sur lame, il y a accroissement (et non pas croissance) proportionnel des dimensions

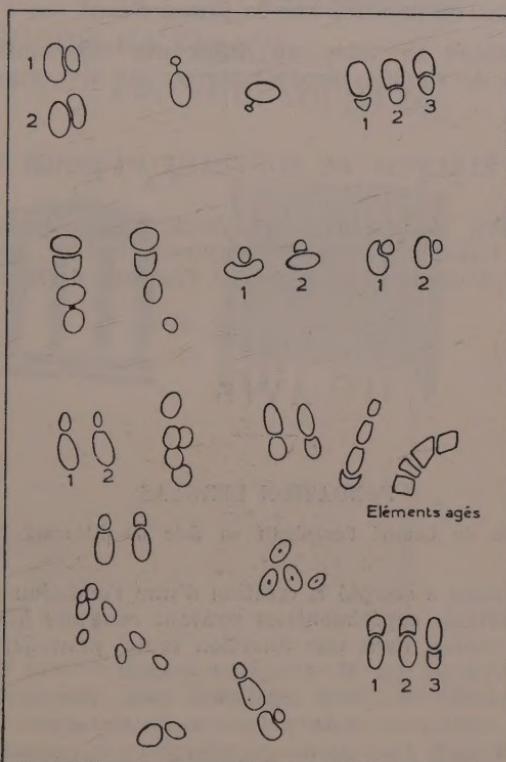


FIG. 3.

cellulaires suivant les axes primitifs, au moins dans le plan transversal ; ces cellules géantes ont un diamètre moyen de 6  $\mu$ .

Autre observation : les cellules âgées surtout dans ces zones déshydratées, où sont maximum les effets apparents des facteurs « liaison cellulaire » et « élongation », ont souvent une forme irrégulièrue, prennent une disposition en mosaïque ou en file.

*3<sup>e</sup> Caractères négatifs.* — Il n'y a pas de mucilage ; la capsule est réduite ; il n'y a ni cils, ni flagelles, ni spores.

Il n'y a pas de processus de conjugaison.

Chaque élément paraît être uninucléé, à noyau central.

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur*.

**La colimétrie de l'eau sur membranes filtrantes**, par R. BUTIAUX, G. MUCHEMBLE et Th. LEURS.

**Description de quelques souches entomophytes de *Bacillus cereus* Frank. et Frank., avec remarques sur leur action et celle d'autres bacilles sur le jaune d'œuf**, par C. TOUMANOFF.

**Action combinée *in vitro* de différents tuberculicides avec l'hydrazide de l'acide isonicotinique**, par M<sup>me</sup> AÏTOFF.

### ÉLECTION DE NOUVEAUX MEMBRES

MM. Kourilsky, Moustardier, Hirt, Jacob, Vallée, Ambert, Joubert, Guyotjeannin, Galland, Hannoun, Fauconnier, Launoy, Dezest, M<sup>le</sup> de Barjac, sont élus membres de la Société Française de Microbiologie.

### AVIS

#### FONDATION BERGLAS

Décision du Comité Consultatif en date du 19 mars 1953.

L'Institut Pasteur a accepté la création d'une Fondation destinée à la recherche de notions expérimentales pouvant conduire à un mode de traitement du cancer, dans une direction toute nouvelle, dont l'idée initiale a été proposée par M. Alexander Berglas.

D'après ce dernier, la cellule cancéreuse passe, comme tout élément vivant, par un cycle naturel de croissance, de vie adulte limitée et de mort. Il conviendrait donc de ne pas chercher — comme cela a été jusqu'ici uniquement pratiqué — à détruire par des moyens artificiels la souche de cellules cancérisées, mais plutôt à favoriser son évolution naturelle devant se terminer par la mort. Les tissus tumoraux présentant généralement une évolution vitale plus rapide que les tissus normaux, il importerait donc de hâter ce cycle en fournissant aux éléments malins tous les facteurs susceptibles de favoriser leur croissance : en accélérant leur rythme vital, on devrait aboutir à l'élimination naturelle du processus tumoral.

La Fondation A. Berglas a été instituée à l'Institut Pasteur en vue de contrôler, en toute objectivité, les fondements réels de cette hypothèse. L'Institut Pasteur estime ne devoir rejeter aucune hypothèse ouvrant un champ de recherches susceptibles d'aboutir à des conclusions biologiques nouvelles et intéressantes.

*Le Gérant : G. MASSON.*